

121,017
attach
Paper
#32

NEW POLYPEPTIDE

Patent Number: JP2227075

Publication date: 1990-09-10

Inventor(s): SASAKI KATSUTOSHI; others: 04

Applicant(s):: KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD

Requested Patent: JP2227075

Application Number: JP19890253097 19890928

Priority Number(s):

IPC Classification: C12N9/72 ; C07K13/00 ; C07K15/14 ; C12N1/21 ; C12N5/10 ;
C12N9/64 ; C12N15/27 ; C12N15/58 ; C12N15/70 ; C12N15/85 ; C12P21/02

EC Classification:

Equivalents: JP2928287B2

Abstract

PURPOSE: To efficiently produce polypeptide by culturing host cell transformed with plasmid including DNA coding polypeptide having amino acid sequence capable of adding at least one saccharides.

CONSTITUTION: Plasmid having amino acid sequence capable of adding at least one new saccharides and containing DNA coding polypeptide capable of adding saccharides by amino acid-substitution, amino acid-omitting or amino acid- inserting to polypeptide is prepared. Host cell is transformed using said plasmid and the transformant is cultured in medium to accumulate polypeptide or glycosylated polypeptide in the cultured matter. Next, polypeptide or glycosylated polypeptide is collected from the cultured matter.

121,017

31月文部2

attach
Paper
#32

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-227075

⑬ Int. Cl.³

C 12 N 9/72
C 07 K 13/00
15/14

識別記号

庁内整理番号

7823-4B
8318-4H
8318-4H※

⑭ 公開 平成2年(1990)9月10日

審査請求 未請求 請求項の数 28 (全94頁)

⑮ 発明の名称 新規ポリペプチド

⑯ 特 願 平1-253097

⑰ 出 願 平1(1989)9月28日

優先権主張

⑱ 昭63(1988)9月29日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭63-245705

① 発 明 者	佐々木 克敏	東京都町田市旭町3-6-6
② 発 明 者	西 達也	東京都町田市中町3-9-11
③ 発 明 者	安村 茂良	東京都町田市旭町3-6-6
④ 発 明 者	佐藤 盛幸	東京都町田市成瀬2730-15
⑤ 発 明 者	伊藤 菁我	神奈川県相模原市相原6-9-48
⑥ 出 願 人	協和醗酵工業株式会社	東京都千代田区大手町1丁目6番1号

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

新規ポリペプチド

2. 特許請求の範囲

(1) 少なくとも1つの新たな糖鎖の付加が可能なアミノ酸配列を有する新規ポリペプチド。

(2) ポリペプチドに対し、アミノ酸置換、アミノ酸欠失あるいはアミノ酸挿入を行うことにより、糖鎖の付加が可能となったものであることを特徴とする請求項1の新規ポリペプチド。

(3) 該アミノ酸配列がN-グリコシレーション結合部位(アスパラギン残基-X残基-スレオニン残基あるいはセリン残基、X残基はプロリン以外のアミノ酸)であることを特徴とする請求項1の新規ポリペプチド。

(4) 請求項1から3のいずれかに記載したポリペプチドに少なくとも1つの糖鎖が付加したグリコシル化ポリペプチド。

(5) 付加した糖鎖が、N-グリコシド結合型糖鎖、

O-グリコシド結合型糖鎖、あるいは化学合成した糖鎖であることを特徴とする請求項4記載のグリコシル化ポリペプチド。

(6) 糖鎖の付加部位がポリペプチドにおけるプロテアーゼの切断部位の近傍(その切断部位から8アミノ酸残基以内)にあることを特徴とする請求項1から5のいずれかに記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。

(7) 糖鎖の付加部位が、ポリペプチドの表面部位にあることを特徴とする請求項1から5に記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。

(8) 請求項1から7のいずれかに記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドがコロニー刺激因子(顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球コロニー刺激因子、マクロファージコロニー刺激因子)、組織プラスミノゲン活性化因子(以下、t-PAと記する)、ウロキナーゼ(以下、UKと略記する)、インターフェロン-α、インターフェロン-β、イ

インターフェロナー、リソホトキシン、リボコルチン、スーパーオキシドジスムターゼ、エリスロポイエチンまたはインターロイキン-1、-2、-3、-4、-5、-6または-7であることを特徴とする請求項1から7に記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。

(9) 請求項1から7のいずれかに記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドが、ヒト顆粒球コロニー刺激因子（以下、hG-CSFと略記する）であり、hG-CSFのスレオニン残基（N末端から1番目）がアラニン残基で、ロイシン残基（N末端から3番目）がスレオニン残基で、グリシン残基（N末端から4番目）がチロシン残基で、プロリン残基（N末端から5番目）がアルギニン残基で、シスチニン残基（N末端から17番目）がセリン残基でそれぞれ置換されていることを特徴とする請求項1から7のいずれかに記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。

(10) 請求項9記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドのアルギニン残基（N末端から6目）がアスパラギン残基で置換されていることを特徴とする請求項9に記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。

末端から164番目）までの間）に存在することを特徴とする請求項1から7のいずれかに記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。

(11) 成熟型UKのフェニールアラニン残基（N末端から164番目）をアスパラギン残基に置換した請求項13記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。

(12) 成熟型UKのロイシン残基（N末端から153番目）をアスパラギン残基に置換し、かつプロリン残基（N末端から155番目）をスレオニン残基に置換した請求項13記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。

(13) 第6表および第7表に示したアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有する請求項13記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。

(14) 請求項1から16のいずれかに記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドのポリペプチド部分をコードするデオキシリボ核酸

化ポリペプチドのアラニン残基（N末端から6目）がアスパラギン残基で置換されていることを特徴とする請求項9に記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。

(15) 請求項9記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドのグルタミン残基（N末端から145番目）がアスパラギン残基で、アルギニン残基（N末端から147番目）がセリン残基でそれぞれ置換されていることを特徴とする請求項9に記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。

(16) 第2表、第3表、および第4表に示したアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有する請求項9記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。

(17) 請求項1から7のいずれかに記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドがUKであり、糖鎖の付加部位が成熟型UKのトロンビン切断部位の近傍（グリシン残基（N末端から149番目）からフェニールアラニン残基（N

(DNA)。

(18) 請求項17に記載のDNAを組み込んでなる組換え体プラスミド。

(19) プラスミドDNAとして、大腸菌トリプトファンプロモーターあるいはSV40初期プロモーターを有するプラスミドDNAを用い、該DNAが該プラスミドDNAのプロモーターの下流に組み込まれたことを特徴とする請求項18記載の組換え体プラスミド。

(20) pAS28、pASN6、pASN145、pSE1UKS1-1dおよびpSEUKS3から選ばれる請求項18または19に記載の組換え体プラスミド。

(21) 請求項18から20のいずれかに記載の組換え体プラスミドを含有する微生物または動物細胞。

(22) 該微生物が大腸菌に属することを特徴とする請求項21記載の微生物。

(23) 該動物細胞がCHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞またはナマルバ細胞であることを特

微とする請求項 21 記載の動物細胞。

- (24) 請求項 21 記載の微生物または動物細胞を培地に培養し、養物中にポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドを蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドまたは該グリコシル化ポリペプチドを採取することを特徴とするポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドの製造法。
- (25) 請求項 21 記載の微生物または動物細胞を、1-デオキシノジリマイシン、1-デオキシマンノジリマイシンまたはスワインソニンの糖鎖の生合成あるいはプロセッシングに関する酵素の阻害剤を含有する培地で培養することにより、付加する糖鎖構造を変化させることを特徴とする請求項 24 記載の製造法。
- (26) 該微生物が大腸菌、酵母またはカビに属することを特徴とする請求項 24 または 25 記載の製造法。
- (27) 該動物細胞が CHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞またはナマルバ細胞であることを特

法に関する。

本発明はすべてのポリペプチドに当てはめることが可能である。本発明によって提供される新たな糖鎖が付加したポリペプチドは、糖鎖の多様な機能が付加されたものであり、天然の蛋白質に比較して物性や活性が優れている。したがって本発明によって提供される糖鎖付加ポリペプチドは、幅広い分野において有用であると期待される。

例えば、本発明のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドがヒト顆粒球コロニー創成因子 (hG-CSF) である場合、適当な部位に新たな糖鎖が付加した hG-CSF は、プロテアーゼに対する抵抗性が増加する。この新規 hG-CSF は、血中におけるクリアランス (除去) が遅くなっていることも十分期待され、医薬品としての利用が期待される。

また、本発明のグリコシル化ポリペプチドがウロキナーゼ (UK) である場合も同様に、新たな糖鎖が適当な部位に付加した UK は、付加しないものより優れた血栓溶解作用を有しており脳血栓、

微とする請求項 24 または 25 記載の製造法。

- (28) 請求項 24 から 27 のいずれかに記載の製造法で採取したグリコシル化ポリペプチドを、シアリダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、 β -マンノシダーゼおよびエンドグリコシダーゼから選ばれたグリコシダーゼまたはシアル酸トランスフェラーゼで処理することにより、付加する糖鎖の構造を変化させることを特徴とするグリコシル化ポリペプチドの製造法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、新たな糖鎖の付加が可能なアミノ酸配列を有する新規ポリペプチドおよびそのグリコシル化ポリペプチド、該ポリペプチドまたは該グリコシル化ポリペプチドをコードするデオキシリボ核酸 (DNA)、該 DNA を含有する組換え体プラスミド、該組換え体プラスミドで形質転換した宿主細胞および形質転換細胞を用いる該ポリペプチドまたは該グリコシル化ポリペプチドの製造

心筋梗塞などの治療薬としての利用が期待される。

従来の技術

大腸菌などの原核生物によって生産される蛋白質が糖鎖を有していないのに対し、酵母、カビ、植物細胞または動物細胞等の真核生物によって生産される蛋白質には糖鎖が結合している場合が多い。

付加する糖鎖は、主として 2 つの群に大別できる。一つは、蛋白質中のアスパラギン (Asn) 残基に結合する N-グリコシド結合型糖鎖で、もう一つは、蛋白質中のセリン (Ser) またはスレオニン (Thr) 残基に結合する O-グリコシド結合型糖鎖である。

N-グリコシド結合型糖鎖は N-アセチルグルコサミン 2 個とマンノース 3 個の五糖よりなるコア構造を共通の基本構造としており、その糖鎖構造から高マンノース型、複合型、そしてハイブリッド型の 3 つに分類されている (第 1 図)。これらのアスパラギン結合型糖鎖は、18~20 のイソプレニユニットからなるポリイソプレノイドア

ルコールであるトリコールにピロリン酸をはさんでN-アセチルグルコサミン2個、マンノース9個、そしてグルコース3個が結合したリビド中間体 (Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol) (第2図) を前駆体としている。

リビド中間体が形成される反応経路は“トリコールリン酸サイクル”としてよく知られている (第3図)。

そして粗面小胞体 (rER) 内腔において生成中のポリペプチド鎖中のAsn-X-Ser/Thrといったアミノ酸配列 (N-グリコシル化部位) 中のAsn残基に、このリビド中間体の糖鎖部分がひとまとめに転移され、N-グリコシド結合を形成する。この場合Xはプロリン (Pro) 以外のどんなアミノ酸でもよく、またこの反応は、膜酵素の1種である“オリゴ糖転移酵素 (Oligo-saccharyl transferase)”によって触媒されることが知られている。この後、rERおよびゴルジ体を通過する過程で糖鎖はトリミングとプロセッシングを受け、高マンノース型、ハイブリッド型あ

るいは複合型として完成される (第4図)。トリミングとプロセッシングの過程においては多くのグリコシダーゼとグリコシルトランスフェラーゼが関与していることが知られている。

高マンノース型は、動植物起源および酵母、カビの糖蛋白質においてしばしば見られるのに対し、複合型糖鎖は動物起源に限定されていると推定されている。

N-グリコシド結合型糖鎖は上述したようにポリペプチド中のAsn-X-Ser/Thr (XはPro以外のアミノ酸) 中のAsn残基に結合するが多くの蛋白質中には非糖鎖結合のAsn-X-Ser/Thr配列が存在しており、この配列が存在すれば必ず糖鎖が付加するというものではない。事実ウィリアム・ジェイ・レナルツ (William J. Lennarz) らは、蛋白質の立体構造が糖鎖の結合を促す上で重要であることを示唆している。それは、Asn-X-Ser/Thrの配列を持った単純なトリペプチドや、天然の蛋白質のように複雑に折りたたまれた空間構造をもたな

い変性蛋白質がインビトロ (in vitro) で酵素的に、比較的容易に糖鎖を結合させるという知見に基づいている。

一方、O-グリコシド結合型糖鎖においては、ポリペプチド中のSerまたはThr残基にN-アセチルガラクトサミンを介して結合し、それにガラクトース、シアル酸、フコース、末梢N-アセチルガラクトサミンが結合しているのが普通である [鈴木 旺ら: 蛋白質、核酸、酵素、30, 513 (1985)]。また上述のN-グリコシド結合型糖鎖の場合と異なり、その合成にrERは関与せず、すべてゴルジ体で行われると考えられている [ジョンソン (Johnson) ら: セル (Cell)、32, 987 (1983)]。また、N-グリコシド結合型の場合とは異なり糖鎖付加におけるアミノ酸配列上の規則性も存在していない。しかしながらPro-Thr/Ser、Thr/Ser-Pro、Thr/Ser-Ileu-ProなどのようにProが近くに存在した場合に糖鎖が付加しやすい傾向にあることが知られている。この場合、Xはどんなアミノ酸でもよい [高橋ら: プロシーデ

ィング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 2021 (1984))]。

糖蛋白質の糖鎖の本質的な生物学的機能については、未知の部分も多いが、多くの糖蛋白質に関する研究により、現在までに糖鎖の多様な機能が明らかにされてきている。

まず、糖鎖は蛋白質を安定化することが知られている。血中におけるクリアランスの遅延もその1例である。大腸癌に遺伝子移入してつくられたヒトエリスロポイエチン (アスパラギン結合型糖鎖を欠く)、あるいは、糖鎖を酵素処理で除去したヒトエリスロポイエチン (製薬する) は、in vitro では活性を示すが、インビボ (in vivo) では急速にクリアランスされ、活性が低いことが知られている [ノーダル (Nordal) ら: エンドクリノロジー (Endocrinology), 116, 2293 (1985) およびブローネ (Browne) ら: コールド・スプリング・ハーバー・シンポジア・オン・クオンティタティブ・バイオロジー (Cold Spr. Harb. Symp. Quant.

Biol.), 51, 693(1986)]。またヒト顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (hGM-CSF) は、天然ではN-グリコシド結合型糖鎖を2本持っているが、糖鎖の本数を減らすとそれに比例してラット血漿からのクリアランス速度が速まることが知られている [ドナヒュー (Donahue) ら: コールド・スプリング・ハーバー・シンポジア・オン・クオンティタティブ・バイオロジー (Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.), 51, 685(1986)]。クリアランスの速度およびクリアランスされる部位は糖鎖の構造によっても変化し、シアル酸がついたhGM-CSFは腎臓でクリアランスされるのに対し、シアル酸を除去したhGM-CSFはクリアランス速度が速まり、肝臓でクリアランスされることが知られている。また、ラット肝初代培養の系で各種のアスパラギン結合型糖鎖生合成阻害剤存在下に生合成された、糖鎖構造の異なる α_1 -acid glycoprotein について、ラットの血漿からのクリアランス速度およびラット濾液からのクリアランス速度を調べたところ、どちらの場

が付加されるとそれが回復することが知られている。この場合、糖鎖の除去により、ジスルフィド結合による蛋白質分子間の会合が誘起され、その結果蛋白質輸送が阻害されることが明らかとなった。また新しく付加した糖鎖は、この会合を阻害することにより蛋白質の正しい立体構造を保持することができ再び蛋白質輸送が可能になったと考えられている。また、その際新たな糖鎖を付加する位置については、かなりの融通性があることが示されている。またその反面、導入する位置によっては天然の糖鎖を有する蛋白質の輸送をも完全に阻害する場合があることも明らかとなった [ローズ (Rose) ら: ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 263, 5948 および 5955 (1988)]。

糖鎖がポリペプチド上の抗原部位をマスクしている例も知られている。hGM-CSF、プロラクチン、インターフェロン- γ 、ラウシャー (Rauscher) 白血病ウイルス gp70 およびインフルエンザヘマグルチニンにおいて、ポリクローナル

抗体、高マシノース型>糖鎖欠損型>ハイブリッド型>複合型 (天然型) の順であった [グロス (Gross) ら: ユーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Eur. J. Biochem.), 162, 83(1987)]。安定化の別の例として、糖鎖がプロテアーゼ抵抗性を付与していることが知られている。例えば、フィブロネクチン (fibronectin) の糖鎖形成をツニカマイシンで阻害すると、得られた糖鎖欠損フィブロネクチンの細胞内蛋白質の分解の速度が増進する [オルデン (Olden) ら: セル (Cell), 13, 461(1987)]。糖鎖の付加により、熱安定性や抗原結性が增大することも知られている。また、エリスロポイエチンや β -インターフェロンなどにおいては、蛋白質の溶解性の増大に糖鎖が寄与していることが知られている。

糖鎖は、蛋白質が正しい立体構造を保持するのにも役立っている。水疱性口内炎ウイルスの膜結合糖蛋白質の天然に存在する2本のN-グリコシド結合型糖鎖を除去すると、蛋白質の細胞表面への輸送が阻害されるが、その蛋白質に新たな糖鎖

抗体またはペプチド上の特定の領域に対する単クローン抗体を用いた実験から、これら蛋白質の糖鎖が、抗体との反応を阻害しているという結論が引き出された。しかし、この反面、ある種の蛋白質においては逆に免疫反応を誘発する場合も知られており、糖鎖が二重の役割を演ずることが示唆されている。

糖鎖自身が糖蛋白質の活性発現に直接関わっている場合もあることが知られている。例えば、黄体形成ホルモン、濾胞刺激ホルモン、絨毛性腺刺激ホルモンのような糖蛋白質ホルモンがそれである。

最後に、糖鎖の重要な機能として、認識現象への関与ということが上げられる。糖鎖が、細胞間、蛋白質間あるいは細胞と蛋白質間の認識現象に関与していると考えられる多くの例が知られており、糖鎖の構造の違いにより生体内クリアランスの場所が異なることもその1例である。

以上糖蛋白質の糖鎖の構造と機能について述べてきた。糖鎖の構造と機能の解析の手段について

は現在著しく進展してきており、ペプチド骨格に結合した糖鎖の物理化学的性質についていろいろな解析が可能となってきた。

とくに糖鎖を逐次解離してゆく特異性の高い酵素(エキソグリコシダーゼ)やペプチド鎖との結合点をペプチド鎖と糖鎖の双方を傷めずに開裂するグリコペプチダーゼやエンド型グリコシターゼが実用になったことによって、糖鎖の生物学的な役割についても詳細な研究ができるようになったことは特筆すべきことであろう。また、グリコシルトランスフェラーゼにより、新たな糖鎖を付加することも可能である。例えば、シアル酸トランスフェラーゼにより、糖鎖の末端にシアル酸を新たに付加することもできる。その他種々のグリコシルトランスフェラーゼやグリコシダーゼの阻害剤を用いることにより、付加する糖鎖を変化させる技術もよく知られている。

先に述べた水泡性口内炎ウイルスの膜結合糖蛋白質のように、糖鎖を付加する技法が糖鎖の機能を研究する目的に用いられた例はあるが、産業上

ブチドのかかる諸性質を改善することは重要な課題である。

問題点を解決するための手段

本発明では、かかる課題を解決するために、生理活性ポリペプチドに新たな糖鎖を付与する方法を開発した。その方法は、プロテアーゼ切断部位近傍などの所望の部位に新たな糖鎖の付加が可能となるように、ポリペプチドのアミノ酸配列を変化させ、その変異ポリペプチドをコードするDNAを組換えDNA技法により構築し、組換え発現ベクターに組み込んだものを微生物または動物細胞に導入し、発現させることを利用した方法である。このような方法によって得られたグリコシル化ポリペプチドの性質を調べたところ、プロテアーゼ抵抗性などのすぐれた性質が付与されていることを見出し、本発明を完成するに至った。

発明の具体的な説明

本発明によれば、少なくとも1つの糖鎖の付加が可能でアミノ酸配列を有する新規ポリペプチドおよびそのグリコシル化ポリペプチド、該ポリペ

プチドの改変に用いられた例はまだない。一般に、生理活性ポリペプチドは、プロテアーゼ切断による活性低下、熱処理による活性低下、あるいは生体内に投与したときにクリアランスを受けやすいことなどの好ましくない性質を有する場合が多い。これまでに、このようなポリペプチドのアミノ酸配列を改変し、新たな糖鎖を意図的に付加することにより、プロテアーゼ抵抗性、熱安定性、あるいは血中安定性などを増加させたという例は知られていない。本発明において意図的に新たな糖鎖を付加することにより、上記ポリペプチドの諸性質を改善する手法を開発した。

発明が解決しようとする問題点

生理活性ポリペプチドは、一般に、プロテアーゼ切断による活性低下、熱処理による活性低下、生体内に投与したときにクリアランスを受けやすいなど、不利な性質を有している場合が多い。たとえば、UKはトロンビンというプロテアーゼによって不活性型になってしまう。生理活性ポリペ

プチドまたは該グリコシル化ポリペプチドをコードするDNA、該DNAを含有する組換え体プラスミド、該組換え体プラスミドを含む微生物または動物細胞、および該微生物または動物細胞を用いる該ポリペプチドまたは該グリコシル化ポリペプチドの製造法が提供される。

本発明の目的は、任意のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドに少なくとも一つの新たな糖鎖を付加することにより、前記した糖鎖の持つ機能のいずれかを、ポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドに新たに付与しようとするものである。例えば本発明は新たな糖鎖を付加することによりポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドを安定化して血中でのクリアランスを延長させ、また、そのポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドを生体内の特定の場所に指向させることを目的とするものである。またプロテアーゼによるポリペプチドの切断が生物学的活性に大きく関与している場合においては、糖鎖を付加することによりプロテアーゼ抵抗性を増加させ、

生物学的活性を制御することができる。

新たな糖鎖の付加が可能なアミノ酸配列をポリペプチド中に作成するためには、ポリペプチドのアミノ酸置換、アミノ酸欠失、アミノ酸挿入などの方法によって行うことができる。

たとえばN-グリコシド結合型糖鎖を結合させるためのアミノ酸としては、アスパラギン (Asn) が、O-グリコシド結合型糖鎖を結合させるためのアミノ酸としては、セリン (Ser)、スレオニン (Thr) が知られているので、これらのアミノ酸がポリペプチド上の好適な位置に存在するようにすればよい。

好適には、Asn-X-Thr/Ser (Xはプロリン以外のアミノ酸) で示されるトリペプチドを、対象とするポリペプチドの適当な部位に導入することによって糖鎖の付加が可能なアミノ酸を該ポリペプチド中に存在させることができる。このトリペプチドの導入は遺伝子の部位特異的変異の方法に従って行うことができる。

新たな糖鎖を付加するにあたって重要なのは、

糖鎖を付加する位置である。前述のように、ポリペプチド上の位置によっては糖鎖が付加しない場合があるし、また新たな糖鎖が付加されても、その結果ポリペプチドの正しい立体構造が破壊され、炭水素が阻害されたり、活性を喪失する場合もある。したがって、新たな糖鎖を付加する位置は少なくともポリペプチドの表面部位にある必要がある。立体構造が既にわかっているポリペプチドにおいては、その表面部位があるからなので、容易に付加部位を決定することができる。また、糖鎖付加による活性低下を最小限におさえるためには、活性部位から立体構造上できるだけ離れている方が望ましい。そこで、立体構造に加え活性部位も明らかなポリペプチドにおいては上記のことを考慮して付加部位を決定できる。一方、ポリペプチドの立体構造が未知の場合には、ポリペプチドの一次構造よりその親水性 (Hydropathy) を計算し、表面部位を推定することができる。また、一次構造からチョーファスマン (Chou-Fasman) (バイオケミストリー (Biochemistry) 13, 211 (1974),

バイオケミストリー (Biochemistry) 13, 222 (1974), アドバンスド・エンザイモロジー (Adv. Enzymol.) 47, 45 (1978)] の方法、あるいはロブソン (Robson) [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.) 107, 327 (1976), 同 120, 97 (1978)] の方法で2次構造を予想することで、ターン構造を形成しそうな場所を推定することもできる。また、各種プロテアーゼで処理して、切断されやすい部位を同定することにより、表面部位に関してさらに詳しい情報を得ることができる。プロテアーゼ切断部位近傍は、ポリペプチドの表面に位置している可能性が高いと考えられるため、ポリペプチドに効率的に糖鎖を付加しようとする際や、天然の蛋白質と同等の活性を有する糖鎖付加ポリペプチドを取得しようとする際には、糖鎖付加の絶好の標的的部位となる。また、プロテアーゼ切断部位近傍に糖鎖が付加されたポリペプチドは、そのプロテアーゼに対して抵抗性になることが期待され、その安定化を図るという意味においても、プロテアーゼ切断部位近 傍は糖

鎖の付加部位として非常に適しているといえる。好適にはポリペプチドのプロテアーゼ切断部位から8アミノ酸残基以内に糖鎖付加部位を導入することが望ましい。

また、立体構造が既知の場合も未知の場合も、上記のようにして選定した部位のいくつかに実際に糖鎖付加部位を導入し、そこに実際に糖鎖が付加するかどうかを確認する必要がある。また、糖鎖が付加されたポリペプチドについては、それが生物学的活性を保持しているか、活性の低下はないか、すぐれた機能が付加されているか、などについて評価する必要がある。

本発明の対象とするポリペプチドとしては、生理活性を有するものであればいずれでもよいが、好適には、コロニー刺激因子 (顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球コロニー刺激因子、マクロファージコロニー刺激因子)、組織プラスミノゲン活性化因子 (t-PA)、ウロキナーゼ (UK)、インターフェロン- α 、インターフェロン- β 、インターフェロン- γ 、リンホ

トキシン、リボコルチン、スーパーオキシドジスムターゼ、エリスロポイエチン、インターロイキン-1、-2、-3、-4、-5、-6または-7などがあげられる。

ポリペプチドに糖鎖を付加する方法は以下のとおりである。まず、プロテアーゼ切断部位近傍などの所望の部位のアミノ酸配列を新たな糖鎖の付加が可能となるように改変した変異ポリペプチドをコードするDNAを組換えDNA技法により構築する。次に、そのDNAを発現ベクターに組み込んだものを微生物（酵母やカビなど）または動物細胞（CHO細胞やナマルバ細胞など）に導入し、発現させることにより、新たな糖鎖の付加したポリペプチドを得ることができる。N-グリコシド結合型糖鎖を付加しようとする際には、糖鎖付加部位にN-グリコシド結合部位(Asn-X-Ser/Thr; XはPro以外の任意のアミノ酸)が生じるように改変すればよい。変異ポリペプチドをコードするDNAの構築は、部位特異的変異や合成DNAリンカーを使用して行うこと

ができる。

また、糖鎖の機能はその構造に大きく依存している。したがって、付加する糖鎖の構造を変化させ、より優れた性質を付加する糖鎖を選択することも重要なことであり、本発明はこうした最適化の過程をも含むものである。糖鎖の構造を変化させる方法としては以下に示すようなものがある。

1) 蛋白質を生産させる宿主を変える。2) 上記の組換え体プラスミドを含有する微生物または動物細胞を、1-デオキシノジリマイシン、1-デオキシマシノジリマイシン、スワインソニンなどの糖鎖の生合成あるいはプロセッシングに係わる酵素の阻害剤を含有する培地で培養する。3) 糖鎖付加タンパクを、シアリダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、 β -マンノシダーゼ、エンドグリコシダーゼ等の各種グリコシダーゼや、シアル酸トランスフェラーゼ等のグリコシルトランスフェラーゼで処理する。

本発明のポリペプチドまたはグリコシル化ポリ

ペプチドがhG-CSF、UKおよびt-PAである場合についてさらに具体的に説明する。

(A) 本発明のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドがhG-CSFである場合:

組換えDNA技法を用いて大腸菌で生産し、精製したhG-CSFおよびhG-CSF誘導体hG-CSF(ND28)(参考例18参照)を用いての解析からhG-CSFの成熟ポリペプチドのN末端より144番目のフェニルアラニン(Pha)残基の後が、キモトリプシンによって分解されやすいことが明らかとなった。またhG-CSF(ND28)に関しては、N末端の4~7アミノ酸残基が種々のプロテアーゼ(ズブチリシン、キモトリプシン、トリプシンなど)によって切断されやすくなっていることも判明した。なおhG-CSF(ND28)は、大腸菌で生産、精製した成熟hG-CSFに比べて、活性が上昇していることが知られている。上述したような知見から、hG-CSF(ND28)のN末端に近い部分およびN末端より144目付近がポリペプチドの

表面に存在していることが推定される。そこでhG-CSF(ND28)のN末端より6番目あるいは145番目のアミノ酸残基に糖鎖を付加することを試みた。hG-CSF(ND28)のN末端より6番目のアミノ酸残基に糖鎖付加部位を持つ誘導体がhG-CSF(ND28N6)でありN末端より145番目のアミノ酸残基に糖鎖付加部位を持つ誘導体がhG-CSF(ND28N145)である。この場合、糖鎖の付加によりプロテアーゼ抵抗性の獲得が期待される。またポリペプチドの安定化により、血中でのクリアランスが遅くなることも期待される。

本発明で用いたhG-CSF、hG-CSF(ND28)、hG-CSF(ND28N6)およびhG-CSF(ND28N145)のアミノ酸配列は、それぞれ第1表、第2表、第3表および第4表に示した。

第 1 表

```

10      20      30      40      50      60
ACCCCTG6G6CCCTGCCAGCTCCCTG6CCCAGAGCTTCCTGCTCAAGT6CTTAGAGCAA
ThrProLeuGlyProAlaSerSerLeuProGlnSerPheLeuLeuLysCysLeuGluGln

70      80      90      100     110     120
GTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAAGCTGTGTGCCACCTACAAG
ValArgLysIleGlnGlyAspGlyAlaAlaLeuGlnGluLysLeuCysAlaThrTyrLys

130     140     150     160     170     180
CTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGTCTGCTGGACACTCTCTG6GCATCCCTG6GCTCCC
LeuCysHisProGluGluLeuValLeuLeuGlyHisSerLeuGlyIleProTrpAlaPro

190     200     210     220     230     240
CTGAGCAGCTGCCCCAGCCAGCCCTG6CAGCTG6CAGGCTGCTTGA6CCAACTCCATAGC
LeuSerSerCysProSerGlnAlaLeuGlnLeuAlaGlyCysLeuSerGlnLeuHisSer

250     260     270     280     290     300
GGCCTTTCTCTACCA6GGGCTCCTG6CAGGCTG6AAGG6ATCTCCCCGAGTTGGGT
GlyLeuPheLeuTyrGlnGlyLeuLeuGlnAlaLeuGluGlyIleSerProGluLeuGly

310     320     330     340     350     360
CCCACCTTGGACACACTG6CAGCTGGACGTCGCCGACTTTGCCACCACCATCTG6CAGCAG
ProThrLeuAspThrLeuGlnLeuAspValAlaAspPheAlaThrThrIleTrpGlnGln

370     380     390     400     410     420
ATGGAAGAACTG6GAATG6CCCTG6CAGCCACCCAGG6TGCCATG6CCG6CCTTC
MetGluGluLeuGlyMetAlaProAlaLeuGlnProThrGlnGlyAlaMetProAlaPhe

430     440     450     460     470     480
GCCTCTGCTTTCCAGCGCCGGGCGAGGAGG6GCTCTAGTTGCCTCCCATCTG6CAGAGCTTC
AlaSerAlaPheGlnArgArgAlaGlyGlyValLeuValAlaSerHisLeuGlnSerPhe

490     500     510     520
CTGGAAGGTGCTGTACCGCGTTCTACGCCACCTT6CCCCAGCCCTGA
LeuGluValSerTyrArgValLeuArgHisLeuAlaGlnPro***

```

第 2 表

```

10      20      30      40      50      60
GCACCAACATATCG6C6CTCGAGTCTACCAAGAGCTTCCTTTTAAAAAGCTTAGAGCAA
AlaProThrTyrArgAlaSerSerLeuProGlnSerPheLeuLeuLysSerLeuGluGln

70      80      90      100     110     120
GTGAGGAAGATCCAGGGCGATG6CGCAGCGCTCCAGGAGAAAGCTGTGTGCCACCTACAAG
ValArgLysIleGlnGlyAspGlyAlaAlaLeuGlnGluLysLeuCysAlaThrTyrLys

130     140     150     160     170     180
CTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGTCTGCTGGACACTCTCTG6GCATCCCTG6GCTCCC
LeuCysHisProGluGluLeuValLeuLeuGlyHisSerLeuGlyIleProTrpAlaPro

190     200     210     220     230     240
CTGAGCAGCTGCCCCAGCCAGGCTG6CAGCTG6CAGGCTGCTTGA6CCAACTCCATAGC
LeuSerSerCysProSerGlnAlaLeuGlnLeuAlaGlyCysLeuSerGlnLeuHisSer

250     260     270     280     290     300
GGCCTTTCTCTACCA6GGGCTCCTG6CAGGCTG6AAGG6ATCTCCCCGAGTTGGGT
GlyLeuPheLeuTyrGlnGlyLeuLeuGlnAlaLeuGluGlyIleSerProGluLeuGly

310     320     330     340     350     360
CCCACCTTGGACACACTG6CAGCTGGACGTCGCCGACTTTGCCACCACCATCTG6CAGCAG
ProThrLeuAspThrLeuGlnLeuAspValAlaAspPheAlaThrThrIleTrpGlnGln

370     380     390     400     410     420
ATGGAAGAACTG6GAATG6CCCTG6CAGCCACCCAGG6TGCCATG6CCG6CCTTC
MetGluGluLeuGlyMetAlaProAlaLeuGlnProThrGlnGlyAlaMetProAlaPhe

430     440     450     460     470     480
GCCTCTGCTTTCCAGCGCCGGGCGAGGAGG6GCTCTAGTTGCCTCCCATCTG6CAGAGCTTC
AlaSerAlaPheGlnArgArgAlaGlyGlyValLeuValAlaSerHisLeuGlnSerPhe

490     500     510     520
CTGGAAGGTGCTGTACCGCGTTCTACGCCACCTT6CCCCAGCCCTGA
LeuGluValSerTyrArgValLeuArgHisLeuAlaGlnPro***

```

第 3 表

10 20 30 40 50 60
 GCACCTACGATCGCAACTCGAGTCTACACAGAGCTTCCTTTTAAAAAGCTTAGAGCAA
 AlaProThrTyrArgAsnSerSerLeuProGlnSerPheLeuLeuLysSerLeuGluGln
 70 80 90 100 110 120
 GTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAAGCTGTGTGCCACCTACAAG
 ValArgLysIleGlnGlyAspGlyAlaAlaLeuGlnGluLysLeuCysAlaThrTyrLys
 130 140 150 160 170 180
 CTGTGCCACCCGAGGAGCTGGTGTCTGCTGCGACACTCTCTGGGCATCCCTGGGCTCCC
 LeuCysHisProGluGluLeuValLeuLeuGlyHisSerLeuGlyIleProTrpAlaPro
 190 200 210 220 230 240
 CTGAGCAGCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACTCCATAGC
 LeuSerSerCysProSerGlnAlaLeuGlnLeuAlaGlyCysLeuSerGlnLeuHisSer
 250 260 270 280 290 300
 GGCCTTTTCCTCTACCAAGGGGCTCCTGCAAGGCCCTGGAAAGGGATCTCCCCGAGTTGGGT
 GlyLeuPheLeuTyrGlnGlyLeuLeuGlnAlaLeuGluGlyIleSerProGluLeuGly
 310 320 330 340 350 360
 CCCACCTTGGACACACTGCAAGCTGGACGTCGCCGACTTTGCCACCACCATCTGGCAGCAG
 ProThrLeuAspThrLeuGlnLeuAspValAlaAspPheAlaThrThrIleTrpGlnGln
 370 380 390 400 410 420
 ATGGAAGAAGCTGGGAATGGCCCTGCTGCAAGGCCACCCAGGGTGCCATGCCGGCCTTC
 MetGluGluLeuGlyMetAlaProAlaLeuGlnProThrGlnGlyAlaMetProAlaPhe
 430 440 450 460 470 480
 GCCTCTGCTTTCCAGCGCCGGGCGAGGAGGGGTCCTAGTTGCCTCCCATCTGCAGAGCTTC
 AlaSerAlaPheGlnArgArgAlaGlyGlyValLeuValAlaSerHisLeuGlnSerPhe
 490 500 510 520
 CTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCCCGAGCCCTGA
 LeuGluValSerTyrArgValLeuArgHisLeuAlaGlnPro***

第 4 表

10 20 30 40 50 60
 GCACCAACATATCGCGCTCGAGTCTACACAGAGCTTCCTTTTAAAAAGCTTAGAGCAA
 AlaProThrTyrArgAlaSerSerLeuProGlnSerPheLeuLeuLysSerLeuGluGln
 70 80 90 100 110 120
 GTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAAGCTGTGTGCCACCTACAAG
 ValArgLysIleGlnGlyAspGlyAlaAlaLeuGlnGluLysLeuCysAlaThrTyrLys
 130 140 150 160 170 180
 CTGTGCCACCCGAGGAGCTGGTGTCTGCTGCGACACTCTCTGGGCATCCCTGGGCTCCC
 LeuCysHisProGluGluLeuValLeuLeuGlyHisSerLeuGlyIleProTrpAlaPro
 190 200 210 220 230 240
 CTGAGCAGCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACTCCATAGC
 LeuSerSerCysProSerGlnAlaLeuGlnLeuAlaGlyCysLeuSerGlnLeuHisSer
 250 260 270 280 290 300
 GGCCTTTTCCTCTACCAAGGGGCTCCTGCAAGGCCCTGGAAAGGGATCTCCCCGAGTTGGGT
 GlyLeuPheLeuTyrGlnGlyLeuLeuGlnAlaLeuGluGlyIleSerProGluLeuGly
 310 320 330 340 350 360
 CCCACCTTGGACACACTGCAAGCTGGACGTCGCCGACTTTGCCACCACCATCTGGCAGCAG
 ProThrLeuAspThrLeuGlnLeuAspValAlaAspPheAlaThrThrIleTrpGlnGln
 370 380 390 400 410 420
 ATGGAAGAAGCTGGGAATGGCCCTGCTGCAAGGCCACCCAGGGTGCCATGCCGGCCTTC
 MetGluGluLeuGlyMetAlaProAlaLeuGlnProThrGlnGlyAlaMetProAlaPhe
 430 440 450 460 470 480
 GCCTCTGCTTTCAATCGATCGGAGGAGGGGTCCTAGTTGCCTCCCATCTGCAGAGCTTC
 AlaSerAlaPheAsnArgSerAlaGlyGlyValLeuValAlaSerHisLeuGlnSerPhe
 490 500 510 520
 CTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCCCGAGCCCTGA
 LeuGluValSerTyrArgValLeuArgHisLeuAlaGlnPro***

本発明では、hG-CSP、hG-CSP [ND28]、hG-CSP [ND28N6] および hG-CSP [ND28N145] をそれぞれコピーするDNAを組換えDNA技法により構築し、組換え発現ベクターに組込んだものを動物細胞に導入し、発現させることにより、hG-CSP、hG-CSP [ND28]、hG-CSP [ND28N6] および hG-CSP [ND28N145] を生産することができる。このようにして得られるポリペプチドのうちhG-CSP [ND28N6] および hG-CSP [ND28N145] においては、生産される全hG-CSPの約 1/3に新たな糖鎖 (N-グリコシド結合型糖鎖) が付加している。またhG-CSP [ND28N6] および hG-CSP [ND28N145] について、新たな糖鎖の付加したものと付加しなかったものとのプロテアーゼ感受性を比較したところ、新たな糖鎖の付加したもののほうがプロテアーゼ抵抗性になっていることが判明した。また、hG-CSP [ND28N6] においては、新たな糖鎖の付加

(pro-UK) が最近注目を集めている。

t-PAはフィブリン凝和性を有するために、血栓に特異的に吸着し、効率よく血栓を溶解すると同時に、全身の血栓亢進も出現しないことが期待される。t-PAには1本鎖型と2本鎖型が存在し、プラスミンにより1本鎖型は2本鎖型に変換される。2本鎖t-PAが活性型であるが、1本鎖t-PAもフィブリン分解物が存在すると、2本鎖t-PAと同等のフィブリン溶解活性を示す。1本鎖t-PAと2本鎖t-PAのフィブリン凝和性を比較した場合、1本鎖t-PAの方がフィブリン凝和性が強いことが明らかにされている [テイト (Tate) ら: バイオケミストリー (Biochemistry) 26, 338 (1987)]。したがって、1本鎖t-PAの方が血栓に対する特異性が高く、2本鎖t-PAより優れているといえる。

一方、UKにも1本鎖型と2本鎖型が存在し、プラスミンにより不活性な1本鎖UKから活性型の2本鎖UKに変換される。この不活性な1本鎖UKはpro-UKとも呼ばれる。この不活性な

したものは、それを酵素的に除去したものに比べて熱に対して安定であることも判明し、本発明の有効性が示された。なお、動物細胞で発現させたhG-CSP [ND28] には新たにO-グリコシド結合が付加することも明らかとなっている。この場合も新たな糖鎖の付加したもののほうがプロテアーゼ抵抗性になっている。

④ 本発明のポリペプチドあるいはグリコシル化ポリペプチドがUKあるいはt-PAである場合:

現在使用されている血栓溶解剤としてはウロキナーゼ (UK) およびストレプトキナーゼ (SK) があるが、これらの血栓溶解剤は血栓成分のフィブリンに対する凝和性を有していない。そのため、血栓を溶解させるには多量投与が必要であり、また血栓に吸着したプラスミノゲンだけでなく血中のプラスミノゲンも活性化することにより、全身凝溶の亢進が起こり、出血傾向が現れる。これらの血栓溶解剤に対し、フィブリン凝和性を有する組織プラスミノゲン活性化因子 (t-PA) とUKの不活性型前駆体であるプロウロキナーゼ

1本鎖UK、すなわちpro-UKはトロンビンというプロテアーゼが存在すると、活性を失った2本鎖型のUKに変換されてしまう [イチノセ (Ichinose) ら: ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) 261, 3488 (1986)] [グアビッチ (Gurewicz) とパネル (Pannell): ブラッド (Blood) 69, 769 (1987)]。このトロンビンに対する感受性はpro-UKにとって不利な性質である。

上述のように、血栓溶解剤であるt-PAおよびpro-UKは、プラスミンやトロンビンなどのプロテアーゼの作用により不利な型に変換してしまう。そこで、本発明においてのべた方法を用いてこれらのプロテアーゼ切断部位の近傍に糖鎖を付加し、これらのプロテアーゼに対する感受性を低くすることができれば、より優れた血栓溶解剤になることが期待できる。このような観点から、成熟型pro-UKの184目のPhe残基をAsn残基に変換し、このAsn残基にN-グリコシド結合型糖鎖を導入した誘導体UK-

S1をコードするDNAならびに成熟型pro-UKの153番目のLeu残基をAsn残基に置換し、かつ155番目のPro残基をThr残基に置換し、このAsn残基にN-グリコシル結合型糖鎖を導入した房導体UK-S3をコードするDNAを構築した。

なお、本発明で用いた天然型 pro-UK 、 UK-S1 および UK-S3 のアミノ酸配列は、それぞれ第5表、第6表および第7表に示した。

表 5

[illegible]

本発明では、*pro-UK*、*UK-S1*および
*UK-S3*をそれぞれコードするDNAを組換え
DNA技法により構築し、組換え発現ベクターに
組み込んだものを動物細胞に導入し、発現させる
ことにより、*pro-UK*ならびに新たな種族が
付加された*UK-S1*および*UK-S3*を製造す
る。このようにして得られた*pro-UK*、*UK*
*-S1*および*UK-S3*の性質を比較したところ、
*UK-S1*および*UK-S3*は天然型*pro-UK*
に比べ、トロンビンに対する感受性が低くなって
いることならびに血中安定性、熱安定性が向上し
ていることが判明し、本発明の有効性が*UK*の場
合においても示されている。

本発明のポリペプチドあるいはグリコシル化ポ
リペプチドが*hG-CSF*、*UK*あるいは*t-PA*
である場合、*hG-CSF*、*UK*あるいは*t-PA*
をコードするDNAとしては、*hG-CSF*、
*UK*あるいは*t-PA*をコードするメッセンジャ
ーRNAから組換えDNA技法で逆転写して得ら
れる*cDNA*、染色体DNAから得られる*hG-*

CSF、*UK*あるいは*t-PA*をコードするDNA、
hG-CSF、*UK*あるいは*t-PA*をコードす
る合成DNAなどが利用できる。

*hG-CSF cDNA*としては、*hG-CSF*
をコードしているものであればいかなるものも用
いられることができるが、具体的には*pCSF2*
を用いることができる。*pCSF2*は、本発明者
によって製造されたものであり、その製造法は参
考例4に記載されている。

*pCSF2*中の*hG-CSF cDNA*は、*M13*
ファージを用いたデオキシ・シーケンス
(*dideoxy sequence*)法〔ジェイ・メッシング(J. Messing)
ら：*Gene* (Gene) 19, 269 (1982)〕により決
定された。*pCSF2*中の*hG-CSF cDNA*
はシグナル配列の一部を欠いているが成熟蛋白質
部分は完全に含んでいる。成熟蛋白質部分の塩基
配列を第1表に示す。

ヒト*t-PA cDNA*あるいはヒト*UK cDNA*
としては、ヒト*t-PA*あるいはヒト*UK*をコー
ドしているものであればいかなるものも用いるこ

とができるが、具体的にはプラスミド*p tPA7*
中のヒト*t-PA cDNA*あるいはプラスミド
*pUK1*あるいは*pUK11*の中のヒト
*UK cDNA*を用いることができる。*p tPA7*、
pUK1、*pUK11*は、本発明者によって製造
されたものであり、その製造法は参考例1、2、
3に記載されている。*pUK1*と*pUK11*中の
ヒト*UK cDNA*は*M13*ファージを用いたデ
オキシ・シーケンス(*dideoxy sequence*)法
により決定した。

*pUK1*と*pUK11*の中のヒト*UK cDNA*
はともに完全な*pro-UK*をコードしていない
が、それぞれの*cDNA*の塩基配列は第5表に示
す塩基配列の一部と一致している。

なお、*p tPA7*を含む大腸菌は *Escherichia*
coli BtPA7 (FERM BP-1467)として、*pUK1*を含
む大腸菌は *Escherichia coli* BUK1 (FERM BP-
1463)として、および*pUK11*を含む大腸菌は
Escherichia coli BUK11 (FERM BP-1464)として、
工業技術院微生物 工業技術研究所(微工研)に附

和62年9月3日付で寄託されている。

hG-CSF、*UK*あるいは*t-PA*をコード
するDNAを組み込むプラスミドとしては、大腸菌
または動物細胞で該DNAが発現できるものなら
いかなるプラスミドも用いることができる。好ま
しくは、大腸菌内で*hG-CSF*、*UK*、あるい
は*t-PA*を発現させるには、適当なプロモータ
ー、例えば、*trp*系、*lac*系のプロモーター
の下流に外来DNAを挿入することができ、しか
もシャイン・ダルグーノ配列(以下SD配列と略
記する)と開始コドン(ATG)の間を適当な距
離、例えば6~18塩基に調整したプラスミドを
用いることができる。具体的に好適なプラスミド
としては、本発明者らによって造成された*pKY*
P10(特開昭58-110800)、*pT r S33*(参考
例5)などがあげられる。

また、*hG-CSF*、*UK*、あるいは*t-PA*
をコードするDNAを動物細胞で発現させる際に
用いるプラスミドとしては、動物細胞で該DNA
を発現できるものならいかなるプラスミドも用い

ることができる。好ましくは、適当なプロモーター、例えばSV40初期プロモーター、SV40後期プロモーターなどの下流に外来DNAを挿入することができ、しかも、ポリAシグナル、スプライシングシグナルなどを有するプラスミドを用いることができる。

具体的に好適なプラスミドとしては、本発明者らによって造成されたPAGE103〔水上：ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 101, 1307-1310(1987)〕、pSEIPA1-9AやpSEIPA1SEldhfr1-9A(参考例9)などがあげられる。

PAGE103を含む大腸菌は *Escherichia coli* EAGE103 (FERM BP-1312) として昭和62年3月23日付で微生物に寄託されている。また、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下dhfrと略記する)遺伝子を選択マーカーとして有するプラスミドとしては、例えば、pSV2-dhfr〔エス・サブラマニ(S. Subramani)ら：モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジ

y (Mol. Cell. Biol.) 1, 854(1981)〕などがあげられる。

hG-CSF、UKあるいはt-PAの新規ポリペプチドおよび新規グリコシル化ポリペプチドをコードするDNAとベクターDNAとの組換えは、制限酵素を用いて両DNAを消化後、T4 DNAリガーゼを用いて結合する一般的組換えDNA技法を用いて行うことができる。結合に際しては、制限酵素を用いて消化したDNA断片の末端を、DNAポリメラーゼI・クレンー断片を用いる埋め込み反応、T4 DNAポリメラーゼを用いる埋め込み反応または削り込み反応を利用して加工する方法やDNAリンカーを用いる方法によっても行うことができる。

hG-CSFcDNAを持つプラスミドとしてpCSF2をpro-UKcDNAを持つプラスミドとしてpUK1およびpUK11を用い、また必要な場合には、化学合成したDNAリンカーや部位特異的変異を用いて、hG-CSF、およびUKの新規ポリペプチドあるいは新規グリコシ

ル化ポリペプチドをコードするDNAを組み込んだ組換え体プラスミドを造成する例を以下に述べる。

まず、hG-CSF前導体hG-CSF〔ND28〕(参考例16参照)を動物細胞で発現させるための組換え体プラスミドpAS28を造成する例を述べる。

第5図に示したようにして、pAS3-3(参考例10)をMluIとApaLIで切断後、約3.0KbのDNA断片を精製する。また同プラスミドをAatIIとMluIで切断後、約6.3KbのDNA断片を精製する。一方、pCIBD28(参考例16参照)をAatIIとXhoIで切断後、約0.3KbのDNA断片を精製する。これら3つのDNA断片と第5図に示した合成DNAをT4 DNAリガーゼにより結合し、pAS28を得る。

次に、hG-CSF〔ND28〕のN末端より第6目のアミノ酸残基にN-グリコシル結合型糖鎖の付加部位を有する新規hG-CSFプラスミドをコードする組換えプラスミドpASN8

を造成する例について述べる。

第6図に示したようにして、pAS3-3をMluIとApaLIで切断後、約3.0KbのDNA断片を精製する。また、pAS28をXhoIとMluIで切断後、約6.55KbのDNA断片を精製する。これら2つのDNA断片と第6図に示した合成DNAをT4 DNAリガーゼにより結合し、pASN6を得る。

次に、hG-CSF〔ND28〕のN末端より第145番目のアミノ酸残基にN-グリコシル結合型糖鎖の付加部位を有する新規hG-CSFポリペプチドをコードする組換え体プラスミドpASN145を造成する例を述べる。

pASN145の造成は部位特異的変異を用いて行う。第7(1)図に示すように、pCIBD28をPvuIIとBamHIで切断後、約0.94KbのDNA断片を精製する。また、M13ファージベクターのM13mp19RF DNAをSmaIとBamHIで切断後、約7.24KbのDNA断片を精製する。こうして得られる2つのDNA断片を

T4 DNAリガーゼにより結合し、p t 19 BD 28 Cを得る。ついで、このp t 19 BD 28 Cを大腸菌JM105にトランスフェクションし、得られたファージより一本鎖p t 19 BD 28 Cを得る。同じ第7(1)図に示すようにして、M13 mp19 RFDNAをHind IIIとEcoRIで切断後、約7.2 KbのDNA断片を精製する。この約7.2 KbのDNA断片と上記で得られた一本鎖p t 19 BD 28 Cを重合し、変性処理の後再びアニールさせることによりギャップ・デュプレックスDNAを生成させ、これを精製する。ついで、このギャップ・デュプレックスDNAに第7(1)図に示した合成DNAをアニールさせた後、クレノー断片とT4 DNAリガーゼにより環状化する。この環状化DNAを大腸菌JM105株にトランスフェクションし、部位特異的変異が導入されたp t 19 BD 28 CN145を得る。

次に第7(2)図に示すようにしてp t 19 BD 28 NCN145をBgl IIとBamHIで切断後、約0.85 KbのDNA断片を精製する。一方、

pCfBD28をBamHIとBgl II切断後、約3.25 KbのDNA断片を精製する。こうして得られる2つのDNA断片を各々T4 DNAリガーゼで結合することにより、pCfBD28N145を得る。

次に、同じ第7(2)図に示すようにして、pCfBD28N145をBam IIIとBamHIで切断後、約1.3 KbのDNA断片を精製する。こうして得た約1.3 KbのDNA断片をDde Iで切断後、DNAポリメラーゼ・クレノー断片で処理することにより突出末端を埋め、さらにAat IIで切断後、約0.2 KbのDNA断片を精製する。また、pAS28をAat IIとXho Iで切断後、約0.8 KbのDNA断片を精製する。また、pSE1PA1SE1dhfr1-9A(参考例9)をSma IとXho Iで切断後、約8.7 KbのDNA断片を精製する。こうして得た約0.2 Kb、約0.8 Kb、約8.7 Kbの3つのDNA断片をT4 DNAリガーゼで結合することによりpASN145を得る。

次に、トロンピン切断部位近傍にN-グリコシ

Y型糖鎖を付加したUK誘導体UK-S1を動物細胞内で発現する組換え体プラスミドpSE1UKS1-1dを造成する例を述べる。

第9図に示したようにして、pUK1(参考例2)をPst IとBamHIで切断した後、890 bpのDNA断片を精製する。一方、M13 mp18 RFDNA【ヤニシュペロン (Yasisch-Perren) ら: ゾーン (Gene) 33, 103 (1985)】をPst IとBamHIで切断した後、約7.2 KbのDNA断片を精製する。このようにして得られる両DNA断片をT4 DNAリガーゼにより結合し、UK-cDNAの一部をM13 mp18ベクターにサブクローン化したプラスミドpUKmpS1を得る。

次いで、常法によりpUKmpS1の一本鎖DNAを調製した後、第10図に示したようにして、UKの184番目のアミノ酸残基にN-グリコシド型糖鎖が付加されるように塩基配列を変える。すなわちPhe-184をAsnに変換するための合成DNA 5'-GGGGAGAAAACA-CCACC-3'とM13 mp18のDNA塩基配

列決定用の合成DNA

5'-GTTTTTCCCAGTCACGAC-3'をプライマーとして、pUKmpS1の一本鎖DNAを大腸菌DNAポリメラーゼI・クレノー断片により二本鎖DNAに変換すると同時に、所望の位置に変異を導入する。このようにして変異を導入した二本鎖DNAをPst IとEcoRIで切断した後、約600 bpのDNA断片を精製する。一方、UK-cDNAを運ぶpUK11(参考例3)をAat IIとPst Iで切断した後、約1.0 KbのDNA断片を精製する。また、UK-cDNAの3'末端側にKpn Iサイトを導入したpUKB101(参考例12)をAat IIとEcoRIで切断した後、約2.9 KbのDNA断片を精製する。このようにして得られる3種類のDNA断片をT4 DNAリガーゼにより結合し、UK誘導体UK-S1をコードする組換え体プラスミドpUKS1を得る。

続いて、第11図に示したようにして、遺伝子増幅用のdhfr遺伝子を持つ外来遺伝子発現ベ

クター

pSE1PA1SE1dhfr1-9A (考例 9) を KpnI と XhoI で切断した後、約 8.8 Kb の DNA 断片を精製した。一方、UK を発現する組換え体プラスミド pSE1UKpro1-1A (参考例 13) を XhoI と BglII で切断した後、約 0.75 Kb の DNA 断片を精製した。また、UK-S1 をコードする pUKS1 を KpnI と BglII で切断した後、約 1.15 Kb の DNA 断片を精製する。このようにして得られる 3 種類の DNA 断片を T4 DNA リガーゼにより結合し、UK-S1 を発現しうる組換え体プラスミド pSE1UKS1-1d を得る。

同様にして UK-S3 を発現しうる組換え体プラスミド pSEUKS3 を得ることができる。

上記組換え技法における反応の条件は、一般的に下記のとおりである。

DNA の制限酵素による消化反応は通常 0.1 ~ 2.0 μg の DNA を 2 ~ 200 mM (好ましくは 10 ~ 40 mM) の Tris-HCl (pH 8.0 ~ 9.5 好ま

[10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 、 1 mM EDTA] および二倍量のフェノール (TE 緩衝液で飽和したもの) を加え、混合した後、-70℃ と 6-5℃ で凍結-融解を 2 回繰り返す、さらに遠心分離によって生じる上層の水層液を分取し、エタノール沈殿によって DNA 断片を回収する方法である。DNA 断片回収機・マックススィール PAE-3241 型 (アトー株式会社製) を用いて、アガロースゲルやポリアクリルアミドゲルから DNA 断片を電気泳動によって溶出し、精製できる [以下、この方法を電気泳動的溶出法 (electro-elution) と略称する] 。

DNA 断片の結合反応は、2 ~ 200 mM (好ましくは 10 ~ 40 mM) の Tris-HCl (pH 6.1 ~ 9.5 、好ましくは pH 7.0 ~ 8.0) 、2 ~ 20 mM (好ましくは 5 ~ 10 mM) の MgCl₂ 、0.1 ~ 1.0 mM (好ましくは 0.5 ~ 2.0 mM) の ATP 、1 ~ 5.0 mM (好ましくは 5 ~ 10 mM) のジチオスレイトール (以下 DTT ともいう) を含む反応液中で、T4 DNA リガーゼ 1 ~ 1,000 単位を用い、

しくは pH 7.0 ~ 8.0) 、0 ~ 200 mM の NaCl 、2 ~ 20 mM (好ましくは 5 ~ 10 mM) の MgCl₂ を含む反応液中で、制限酵素 0.1 ~ 100 単位 (好ましくは 1 μg の DNA に対して 1 ~ 3 単位) を用い、20 ~ 70℃ (至適温度は用いる制限酵素により異なる) において、15 分間 ~ 24 時間行う。反応の停止は、通常 55 ~ 75℃ で 5 ~ 30 分間加熱することによるが、フェノールまたはジエチルピロカーボネートなどの試薬により制限酵素を失活させる方法も用いることができる。

制限酵素消化によって生じた DNA 断片あるいはギャップト・デュプレックス DNA の精製は、低融点アガロースゲル電気泳動法 (以下、LGT 法と略記する) [エル・ウィスランダー (L. Nieslander) : アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry) 99, 305 (1979)] あるいはアガロースゲル・凍結融解法 (以下、AFT 法と略記する) を用いて行うことができる。この AFT 法とは、DNA 断片を含むアガロースゲル (0.7 ~ 1.5 %) のスライスに対して、等量の TE 緩衝液

1 ~ 37℃ (好ましくは 3 ~ 20℃) で 15 分間 ~ 72 時間 (好ましくは 2 ~ 20 時間) 行う。

結合反応によって生じた組換え体プラスミド DNA は、必要によりコーエンらの形質転換法 [エス・エヌ・コーエン (S. N. Cohen) ら : プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) , U.S.A. 69, 2110 (1972)] あるいはハナハンの形質転換法 [Hanahan : ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.) 168, 557 (1983)] を用いて、大腸菌に導入する。

結合反応によって生じた組み換え体 M13 ファージ RF DNA は、必要により公知のトランスフェクション法 [口野重幸ら : 蛋白質・核酸・酵素 29, 294 (1984)] によって、大腸菌 JM105 株 [ジェイ・メッシング (J. Messing) ら : ジーン (Gene) 33, 103 (1985)] に導入する。

組換え体プラスミド DNA および組み換え体 M13 ファージ RF DNA を持つ大腸菌から該 DNA の単離は、バーンボイムらの方法 [エイチ・シ

ー・バーンボイム (H. C. Birnboim) ら: スクレイ
ッタ・アシュバ・リサーチ (Nucleic Acids Res.)
7, 1513 (1979)] などを用いて行う。

組み換え体 M13 ファージからの一本鎖 DNA
の単鎖は公知の方法 [口野嘉幸ら: 蛋白質・核酸
・酵素 29, 294 (1984)] に従って行う。

本発明で使用するデオキシオリゴヌクレオチド
は、リン酸アミダイト法による固相合成法 (S. L.
Beaucage ら: テトラヘドロン・レターズ (Tetra-
hedron Lett.) 22, 1859 (1981))、および L. J.
BcBrie ら: 同 24, 245 (1983)] に従い、アプライ
ド・バイオシステムズ社 380A・DNA 合成機
(Applied Biosystems Inc., Foster City, CA
9404) を用いて合成することができる。合成さ
れたデオキシオリゴヌクレオチドを他の DNA 断
片と結合させる反応に用いる場合には、約 20 ピ
コモル (pmoles) のデオキシオリゴヌクレオチドを
20 μl の T4 キナーゼ緩衝液 [50mM Tris-HCl (pH
7.6), 10mM MgCl₂, 5mM DTT, 0.1mM
EDTA, 0.5mM ATP] 中で、5 単位の T4

DNA キナーゼを加えることにより、5'-リン酸
化する。ハイブリダイゼーション用のプローブと
して用いる場合には、上記の T4 キナーゼ緩衝液
の中の 0.5mM ATP の代わりに 20~50 μCi
の [γ -³²P] ATP (3000 Ci/μmol, アマーシ
ャム (Amersham, Arlington Heights, IL)) を用い
て、その 5' 末端を放射能標識する。

プラスミド DNA の構造解析については、プ
ラスミド DNA を 1~10 種類の制限酵素で消化後
アガロースゲル電気泳動あるいはポリアクリルア
ミドゲル電気泳動により切断部位を調べる。さら
に DNA の塩基配列を決定する必要があるときは
M13 ファージを用いたディデオキシ・シーケン
ス (dideoxy sequence) 法によって決定する。

本発明のポリペプチドおよびグリコシル化ポリ
ペプチドは大腸菌あるいは動物細胞を宿主として
用いることにより、以下のようにして製造するこ
とができる。

まず、大腸菌を宿主として新規 hG-CSP
ポリペプチドを生産する例について述べる。

プラスミド (例えば pCIBD28N145)
を用いて大腸菌 K-12 MM294 株 (Proc. Natl.
Acad. Sci., USA, 73, 4174, 1976) を形質転換さ
せ、アンピシリン耐性 (Ap^r 以下同じ) のコロニ
ーの中から pCIBD28N145 を有する大腸
菌を選び出す。pCIBD28N145 を有する
大腸菌を培地に培養することにより培養物中に新
規 hG-CSP ポリペプチドを生産させることが
できる。

ここで用いる培地としては大腸菌の生育ならび
に新規 hG-CSP ポリペプチドの生産に好適な
ものならば合成培地、天然培地のいずれも使用で
きる。

炭素源としては、グルコース、フラクトース、
ラクトース、グリセロール、マンニトール、ソル
ビトールなどが、窒素源としては、NH₄Cl、(NH₄)₂SO₄、
カゼミノ酸、酵母エキス、ポリペプトン、肉エキ
ス、バクトトリプトン、コーン・スティープ・リ
カーなどが、その他の栄養源としては K₂HPO₄、
KH₂PO₄、NaCl、MgSO₄、ビタミン B₁₂、MgCl₂、

などが使用できる。

培養は pH5.5~8.5、温度 18~40℃ で通気
攪拌培養により行われる。培養 5~90 時間で培
養菌体中に新規 hG-CSP ポリペプチドが蓄積
するので、培養物から菌体を養殖し、菌体を超音
波処理により破砕し、遠心して得られる菌体残渣
を得る。この菌体残渣からマーストンらの方法
(P. A. O. Marston ら: BIO/TECHNOLOGY 2, 800
(1984)) あるいはベニカらの方法 (Pennica et al.
: ナイチャー (Nature) 301, 214 (1983))、ある
いはウィンクラーらの方法 (Winkler et al.: バ
イオテクノロジー (BIO/TECHNOLOGY) 3, 990
(1985)) を用いることにより、新規 hG-CSP
ポリペプチドを抽出・精製・可溶化・再生するこ
とができる。

次に、動物細胞を宿主として新規 hG-CSP
ポリペプチドあるいは新規 hG-CSP グリコシ
ル化ポリペプチドを生産する方法について述べる。

新規 hG-CSP ポリペプチドあるいは 規
hG-CSP グリコシル化ポリペプチドを発現さ

せる際の主としては、該ポリペプチドあるいは該グリコシル化ポリペプチドを発現できるものならいかなる動物細胞も用いることができる。具体的に好適な動物細胞としては、d h f r が欠損した CHO 細胞 [ジー・ウルラウブ & エル・エー・チェイシン (G. Urlaub & L. A. Chasin): Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77, 4216 (1980)] などがあげられる。

以下に、新規 hG-CSP を発現しうるプラスミドとして pASN8、宿主として d h f r を欠損した CHO 細胞を用いて新規 hG-CSP ポリペプチドあるいは新規 hG-CSP グリコシル化ポリペプチドを製造する例を述べる。

プラスミド pASN8 を例えばリン酸カルシウム法 [グラハム & ファン・デル・エブ (Graham & Van der Eb): ヴィロロジ (Virology) 52, 546 (1978)] により d h f r 欠損 CHO 株に導入する。pASN8 を有する形質転換株は例えば G418 および透析ウシ胎児血清を含む MEM ALPHA 培地 (リボ核酸およびデオキシリボ核酸不含有:

ギブコ・オリエンタル社製) により選択することができる。さらに形質転換株の中からメソトレキセートを用いて新規 hG-CSP ポリペプチド遺伝子が増幅された形質転換株をすることもできる。得られた形質転換株を培地に培養することにより培養物中に新規 hG-CSP ポリペプチドあるいは新規 hG-CSP グリコシル化ポリペプチドを生成させることができる。

培地としては、各種血清 (例えばウシ胎児血清) を加えたハム F10 培地、ハム F12 培地 (以上フローラボ社製)、ダルベッコ MEM 培地、RPMI-1640 培地 (以上日本製薬社製)、MEM ALPHA 培地およびこれらの混合培地が用いられる。培地には必要により、グルタミン 0.5~5 mM、抗生物質 [ペニシリン (25U/ml)、ストレプトマイシン (25μg/ml)、G418 (0.3mg/ml) など]、重曹 (0.01%) などを適量加えてもよい。

培養には、種々の培養ビン、ディッシュ、ローボットル、スピナーフラスコ、ジャーファー

メンターなどを用いることができる。培養は、通常細胞密度 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/ml とし、30~40℃、2~10 日間行くと、各細胞密度に応じ、本発明物質が主に細胞外に分泌される。

培養物から細胞を遠心除去し、遠心後の上清から新規 hG-CSP ポリペプチドあるいは新規 hG-CSP グリコシル化ポリペプチドを分離抽出する。

以上、hG-CSP の場合について、大腸菌あるいは動物細胞を宿主とした新規ポリペプチドおよび新規グリコシル化ポリペプチドの製造法について述べたが、UK あるいはその他の任意の蛋白質の場合も同様に製造することができる。

また上記のようにして得られた hG-CSP 活性の測定は以下のように行う。

8~12 週令の C3H/Ho 雄マウス (静岡県実験動物協同組合) の大腿骨より骨髓細胞を無菌的にとり出し、牛胎児血清 (FBS) を 10% 添加した α -Minimum Essential Medium (Flow Laboratories, 以下 α -MEM 培地とす) に懸

濁する。この細胞 (約 5×10^6 個) 懸濁液 1.5 ml を、ナイロン・ウール (Nylon wool) (和光純薬、Nylon Fiber 146-04231) をつめたカラム (0.3 g) に浸漬し、5% CO₂、インキュベーター内にて 37℃ で 90 分間反応させる。次いで予め 37℃ に加温した α -MEM 培地をカラムに流し、溶出してくるナイロン・ウール非吸着性の骨髓細胞を得る。この細胞を α -MEM 培地で一回洗浄し、所定の濃度に調整する。

次いで、岡部らの方法 [Okabe T. et al., Cancer Research 44, 4503-4506 (1986)] に準じて骨髓造血幹細胞コロニー形成能を測定する。すなわち、 α -MEM 0.2 ml、FBS 0.4 ml および 2 段階希釈した各サンプル 0.2 ml の混液に、上記の方法で調製した骨髓細胞 (2×10^6 個/ml) の 0.2 ml を混和する。これに 42℃ に保温した 0.6% 寒天 (Difco, Agar purified # 0560-01) 溶液を等量 (1.0 ml) 混和し、その 0.5 ml を 24 穴マルチディッシュ (Nunc 社製、# 143982) に接種する (5×10^4 個/dish, n=3)。5% CO₂、4

ンキュベーター中で37℃で78時間 養し、40個以上の細胞からなるコロニーの数を顕微鏡 (Olympus 社製、X40) で計数する。コロニー計数後、注意深くスライドガラス上にとり出し、アセトン・ホルマリン混液で30秒間固定後、Kubotaらの方法 [Kubota K. et al.; Exp. Hematology, 8, 339-344 (1980)] でエステラーゼ2重染色を施し、各コロニーの同定を行う。

各サンプルの力価は、コロニー形成試験の2段階稀釈に於ける計数結果から以下の様に算出する。スタンダードとして用いたインタクトG-CSFのコロニー形成の最大値の%値を与える活性を50単位と定義し、これに各サンプルの稀釈率および単位ml当りの活性に換算するため、20を乗じて力価 (単位) とする。比活性は、単位蛋白質 (mg) 当りの力価 (単位/mg) で表示する。

また、hG-CSFの蛋白質量は、抗hG-CSF単クローン抗体を用いたエンザイム・リンクド・イムノ・ソルベント・アッセイ (ELISA) によって求める。なお、このときの標準物質とし

ては、大腸菌で生産、精製し、ローリー法によって定量したhG-CSF標品を用いる。また抗hG-CSF単クローン抗体は、花井らの方法 [花井ら: キャンサー・リサーチ (Cancer Res.), 46, 4438 (1986)] に従って調製したものを用いる。t-PAまたはUKの活性はフィブリン・プレート・アッセイ法 [Granelli-PipernoとReich: ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メデイスン (J. Exp. Med.), 148, 223 (1978)] によって測定することができる。

以下、本発明のポリペプチドあるいはグリコシル化ポリペプチドがhG-CSFまたはUKである場合の実施例を述べる。実施例1から5は、本発明のポリペプチドあるいはグリコシル化ポリペプチドがhG-CSFである場合の実施例で、実施例6から13はUKの場合の実施例である。

実施例1.

hG-CSF誘導体hG-CSF (ND28) (参考例16参照) を動物細胞で発現するための組換え体プラスミドpAS28の造成 (第5図参

照) :

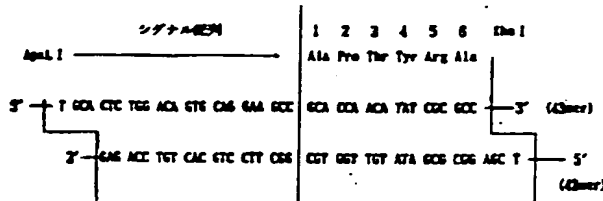
参考例10で得られたpAS3-3 2 μ gを10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、7 mM MgCl₂、6 mM 2-メルカプトエタノールおよび150 mM NaClを含む緩衝液 (以下 "Y-150緩衝液" と略記する) 20 μ lに溶かし、制限酵素MluI (宝酒造社製; 以下制限酵素については特記しない限りすべて宝酒造社製) を10単位加え、37℃で2時間消化反応を行った。その後、ApaIを5単位加え、さらに37℃で10分間部分消化反応を行った。この反応液からLGT法により約3.0 KbのDNA断片約0.5 μ gを精製、回収した。

また同プラスミド2 μ gを10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、7 mM MgCl₂、6 mM 2-メルカプトエタノールおよび50 mM KClを含む緩衝液 (以下 "K-50緩衝液" と略記する) 20 μ lに溶かし、制限酵素AatII (東洋紡績社製) を10単位加え、37℃で2時間消化反応を行った。その後、NaCl濃度が100 mM

になるようにNaClを添加し、10単位のMluIを加え、37℃でさらに2時間反応を行った。この反応液からLGT法により約6.3 KbのDNA断片を約1 μ g精製、回収した。

別に、pCfBD28 (参考例16参照) 2 μ gをK-50緩衝液20 μ lに溶かし、制限酵素AatII (東洋紡績社製) を10単位加え、37℃で2時間消化反応を行った。その後、NaCl濃度が50 mMになるようにNaClを添加し、10単位のXhoIを加え37℃でさらに2時間消化反応を行った。この反応液からLGT法により約0.3 KbのDNA断片約0.1 μ gを精製、回収した。

一方、成熟型hG-CSFのN末端のアミノ酸であるThrをAlaに、3番目のアミノ酸であるLeuをThrに、4番目のアミノ酸であるGlyをTyrに、5番目のアミノ酸であるProをArgに置換するために、下記のDNAリンカーを合成した。



まず、一本鎖 DNA (43mer、2種) をアプ
ライド・バイオシステムズ社 380A・DNA合
成機を用いて合成した。次に、合成した DNA
(43mer、2種) をおのおの 20 ピコモルずつ、
50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、10
mM MgCl₂、5 mM ユチオスレイトール、
0.1 mM EDTA および 1 mM ATP を含む
緩衝液 (以下この緩衝液を "T4 キナーゼ緩衝液
と略記する) 40 μl に溶かし、T4 ポリヌクレオ
チドキナーゼ (宝酒造社製: 以下同じ) 30 単位
を加えて、37℃ で 60 分間リン酸化反応を行っ
た。

上記で得た、pAS3-3 由来の MluI -
ApaI 断片 (約 3.0 Kb) 0.5 μg と同プラスミ
ド由来の AatII-MluI 断片 (約 6.3 Kb)

C. Birnboim) ら: スクレイック・アッシュ・リナ
ーチ (Nucleic Acids Res.) 7, 1513 (1979))

(以下、プラスミド DNA の単離はこの方法を用
いる) に従ってプラスミド DNA を単離した。

得られたプラスミドの構造は、制限酵素消化お
よび M13 ファージを用いたディデオキシ・シー
クエンス法により確認した。このプラスミドを
pAS28 (第5図参照) と呼ぶ。プラスミド
pAS28 を含む微生物は *Escherichia coli*
BAS28 PERM BP-2069 として昭和 63 年 9 月 24 日
付で農工研に寄託してある。該プラスミドがコー
ドするポリペプチド (hG-CSP 誘導体) は、
成熟型 hG-CSP に比べて以下のようにアミノ
酸残基が置換されている。

1.0 μg および pCfBD28 由来の AatII -
XhoI 断片 (0.3 Kb) 0.1 μg を 20 mM Tris
-HCl (pH 7.6)、10 mM MgCl₂、
10 mM ユチオスレイトール および 1 mM ATP
を含む緩衝液 (以下この緩衝液を "T4 リガーゼ
緩衝液" と略記する) 25 μl に溶かし、この混合
液に上記 DNA リンカーを約 1 ピコモル加えた。
この混合液にさらに T4 DNA リガーゼ (宝酒
造社製: 以下同じ) 400 単位を加え、4℃、
18 時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて
大腸菌 HB101 株 (ポリマー (Bolivar) ら: ジ
ーン (Gene) 2, 75 (1977)) をコーエンらの方法
(エス・エヌ・コーエン (S. N. Cohen) ら: プロシ
ーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー
・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA,
69, 2110 (1972)) (以下、大腸菌の形質転換に
はこの方法を用いる) により形質転換し、アンピ
シリン (Ap) 耐性株を得た。この形質転換体か
ら公知の方法 [エイチ・シー・バーンボイム (H.

アミノ酸置換の位置 (hG-CSP のアミノ酸)	プラスミド
	pAS28
1 番目 (Thr)	Ala
3 番目 (Leu)	Thr
4 番目 (Gly)	Tyr
5 番目 (Pro)	Arg
17 番目 (Cys)	Ser

pAS28 がコードするポリペプチド (hG -
CSP 誘導体) を以後 hG-CSP [ND28]
と呼ぶ。

実施例 2

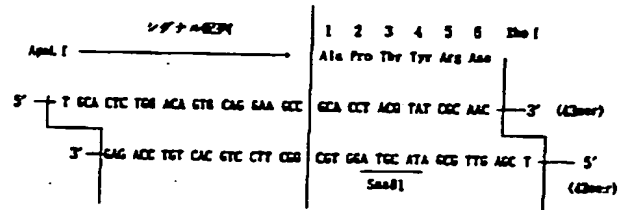
hG-CSP [ND28] (参考例 16 参照)
の N 末端から第 6 番目のアミノ酸残基に N-グリ
コシド結合型糖鎖の付加が可能となった新規 hG
-CSP ポリペプチドをコードする組換え体プラ
スミド pASN6 の造成 (第6図参照):

例 10 で得られた pAS3-3 2 μg を Y
-150 緩衝液 20 μl に溶かし、制限酵素 Mlu
I 10 単位を加え、37℃ で 2 時間消化反応を

行った。その後、ApaIを5単位加え、さらに37℃で10分間部分消化反応を行った。この反応液からLGT法により約3.0KbのDNA断片約0.5μgを精製、回収した。

別に、前項で得たpAS28 2μgをY-150緩衝液20μlに溶かし、制限酵素XhoIとMluIをそれぞれ10単位加え、37℃で2時間消化反応を行った。この反応液からLGT法により、約6.55KbのDNA断片1.0μgを精製、回収した。

一方、実施例1のpAS28がコードするhG-CSP [ND28]のN末端から第6番目のアミノ酸であるAlaをAsnに置換し、N-グリコシド結合型糖鎖の付加部位を形成するために下記のDNAリンカーを合成した。下記DNAリンカー中には新たにSnaBI切断部位が生じるように設計されているため、同リンカーが組み込まれたことは制限酵素SnaBIで切断することにより確認することができる。



一本鎖DNA (43mer、2種) はアプライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成機を用いて合成した。

合成したDNA (43mer、2種) はおのおの20ピコモルずつ、40μlのT4キナーゼ緩衝液に溶かし、T4ポリヌクレオチドキナーゼ30単位を加えて37℃で80分間リン酸化反応を行った。

上記で得たpAS3-3由来のMluI-ApaI断片 (約3.0Kb) 0.5μgとpAS28由来のXhoI-MluI断片 (約6.55Kb) 1μgを全量30μlのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、この混合液に上記DNAリンカーを約1ピコモル加えた。この混合液にさらに4000単位のT4DNAリガ

ーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

組換え体プラスミドを含む反応混合物を用いて、大腸菌HB101株をコーエンらの方法 (前述) により形質転換し、Ap^r耐性株を得た。この形質転換株より、公知の方法に従って、プラスミドDNAを分離、精製した。該プラスミドDNAの構造は、制限酵素消化およびM13・ファージを用いたディデオキシ・シーケンス法により確認した。このプラスミドをpASN6と呼ぶ。プラスミドpASN6を含む微生物はEscherichia coli EASN6 PERM BP-2070として昭和63年9月24日付で農工研に寄託してある。該プラスミドがコードするポリペプチド (hG-CSP誘導体) は、成熟型hG-CSPと比べ以下のようにアミノ酸置換されている。

アミノ酸置換の位置 (hG-CSPのアミノ酸)	プラスミド pASN6
1番目 (Thr)	Ala
3番目 (Leu)	Thr
4番目 (Gly)	Tyr
5番目 (Pro)	Arg
6番目 (Ala)	Asn
17番目 (Cys)	Ser

pASN6がコードするポリペプチド (hG-CSP誘導体) を以後hG-CSP [ND28N6]と呼ぶ。

実施例3

hG-CSP [ND28] (参考例1:6参照) のN末端から第145番目のアミノ酸残基にN-グリコシド結合型糖鎖の付加が可能となった新規hG-CSPポリペプチドをコードする組換え体プラスミドpASN145の造成 (第7(1)図および第7(2)図参照) :

(a) 誘型一本鎖DNA (一本鎖p198028C) の造成:

pCIBD28 (考例16 照) 3 μ gを10 mM Tris-HCl (pH7.5)、7 mM MgCl₂、6 mM 2-メルカプトエタノールを含む緩衝液 (以下“Y-0緩衝液”と 記する) 20 μ lに溶かし、制限酵素Pvu IIを10単位に加え37℃で2時間消化反応を行った。その後、NaCl濃度が100 mMになるようにNaClを添加し、10単位のBamHIを加えて37℃でさらに2時間反応を行った。

この反応液からLGT法により、hG-CSF (ND28) のC末端部分をコードする約0.94 KbのDNA断片 (Pvu II-BamHI断片) 約0.5 μ gを得た。

一方、M13ファージベクターであるM13 mp19 RFDNA (宝酒造社製) 1 μ gを全量50 μ lのY-0緩衝液に溶かし、制限酵素Sma Iを10単位に加え、37℃、2時間消化反応を行った。その後、NaCl濃度が100 mMになるようにNaClを添加し、制限酵素BamHIを10単位に加え37℃、2時間消化反応を行った。この反

応液からLGT法により約7.24 KbのDNA断片 (Sma I-BamHI断片) 約0.8 μ gを得た。

上記で得たPvu II-BamHI断片 (約0.94 Kb) 0.2 μ gと、Sma I-BamHI断片 (約7.24 Kb) 0.05 μ gをT4リガーゼ緩衝液50 μ lに溶かし、この混合液にT4 DNAリガーゼ400単位を加え12℃、16時間結合反応を行った。

次に、公知の方法 (メッシング (Messing) ら: メソッド・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology) 101, 20 (1983)) に従い、上記反応液を用いて大腸菌JM105株をトランスフェクションし、組換え体ファージを得た。この組換え体ファージの感染した大腸菌JM105株の培養菌体より、プラスミドDNA回収法に準じて、組換え体M13ファージRFDNAを回収した。このRFDNA (これをp19BD28Cと呼ぶ) の構造は、BamHI, EcoRI, Bgl IIで切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により確認した。この組換え体ファージより、前記公

知の方法に従って一本鎖p19BD28Cを回収し鋳型とした。

(b) ギャップト・デュプレックスDNA (Gapped Duplex DNA) の造成:

M13 mp19 RFDNA (宝酒造社製) 3 μ gを10 mM Tris-HCl (pH7.5)、7 mM MgCl₂、8 mM 2-メルカプトエタノールおよび100 mM NaClを含む緩衝液 (以下“Y-100緩衝液”と略記する) 30 μ lに溶かし、制限酵素EcoRIとHind IIIをそれぞれ10単位ずつに加え、37℃で2時間消化反応を行った。この反応液からLGT法により約7.2 KbのDNA断片 (EcoRI-Hind III断片) 約2.5 μ gを得た。

このmp19 RFDNA由来のEcoRI-Hind III断片 (約7.2 Kb) 2 μ gと前項で得た鋳型一本鎖DNA、p19BD28C 1 μ gを50 mM Tris-HCl (pH7.8)、7 mM MgCl₂、および8 mM 2-メルカプトエタノールを含む緩衝液 (以下“クレノー緩衝液”と略

記する) 27 μ lに溶かし、100℃で6分間煮沸することによりDNAを変性させた。その後、65℃で10分間、37℃で40分間、4℃で40分間、水中で10分間放置し、アニール反応を行い鋳型中のhG-CSF遺伝子部分だけが一本鎖となったギャップト・デュプレックスDNAを生成させた。生成したギャップト・デュプレックスDNAはLGT法により回収した。

(c) 突然変異誘発 (p19BD28C Δ 145 の造成)

実施例1で得たpAS28がコードするhG-CSF (ND28) のN末端から第145番目のアミノ酸であるGlnをAsnに、第147目のアミノ酸であるArgをSerに置換し、N-グリコシド結合型糖鎖の付加部位を形成するために、以下に示す一本鎖DNAを合成した。下記一本鎖DNA中には、新たにPvu Iサイトが生じるように設計されているので、突然変異が導入されたものはこれを制限酵素Pvu Iで切断することにより確認することができる。

次に、このリン酸化した1本鎖DNA 0.2 μ gと前項で得たギャップト・デュプレックスDNA 0.1 μ gを6.5 mM Tris-HCl (pH 7.5)、8 mM MgCl₂、1 mM 2-メルカプトエタノールおよび100 mM NaClを含む緩衝液34 μ lに溶かし、65℃で60分間、室温で30分間放置し、1本鎖DNAをギャップト・デュプレックスDNAにアニールさせた。この溶液にdATP、dTTP、dCTP、

該反応液を用いた大腸菌HB101株を形質転換し、Ap耐性株を得た。該形質転換株よりプラスミドDNAを単離し制限酵素切断により構造解析を行った。目的の構造を有するプラスミドDN

前項で得た p t 19BD28CN145 3 μg
を 50 μl の Y-100 緩衝液に溶かし、制限酵素
Bgl I (ベーリンガー・マンハイム社製) およ
び Bam H I をそれぞれ 10 単位加え、37℃で
2 時間消化反応を行った。反応液から L G T 法に
より、前項で導入した変異部位を含む約 0.85 Kb

前項で得た pCf1BD28N145、50 μg の Y-100 緩衝液に溶かし、制限酵素 Ban III (東洋紡績社製) および Bam HI を各々 10 単位加え、37℃ で 2 時間消化反応を行った。この反応液から LGT 法により約 1.3 Kb の DNA 断片 (Ban III-Bam HI 断片) 1 μg を得た。この約 1.3 Kb の DNA 断片 1 μg を 50 μg の Y-100 緩衝液に溶かし、制限酵素 Dde I (東洋紡績社製) を 10 単位加え 37℃ で 2 時間消化反応を行った。フェノール-クロロホルム等量混合液による抽出 (以下フェノール-クロロホルム抽出と略記する) およびエタノール沈殿で DNA を回収し、30 μg のクレノー緩衝液に溶かし、DNA ポリメラーゼ I・クレノー断片を 2 単位加え 37℃ で 1 時間反応を行った。88℃ で 10 分間処理し DNA ポリメラーゼ I・クレノー断片を失活させ後、エタノール沈殿で DNA を回収した。回収した DNA は、20 μg の K-50 緩衝液に溶

かし、制限酵素Aat II (東洋紡績社製) 10単位を加えて37℃、2時間消化反応を行った。この反応液よりLGT法により約0.2KbのDNA断片(Dde I (平垣末雄) - Aat II断片) 約0.1μgを得た。

別に実施例1で得たPAS28の2μgを20μlのK-50緩衝液に溶かし、制限酵素Aat II (東洋紡績社製) 10単位を加え、37℃で2時間消化反応を行った。その後、制限酵素Xho Iを5単位加え、37℃でさらに10分間部分消化反応を行った。この反応液よりLGT法により約0.8KbのDNA断片(Aat II-Xho I断片) 約0.1μgを得た。

一方、参考例9で得たpSB1PAISBldhfr1-9A 2μgを20μlのY-0緩衝液に溶かし、制限酵素Sma Iを10単位加え、37℃で2時間消化反応を行った。その後、NaCl濃度が100mMになるようにNaClを添加し、制限酵素Xho Iを10単位加え、37℃でさらに2時間消化反応を行った。この反応液からLGT法により約8.7

KbのDNA断片(Sma I-Xho I断片) 約1μgを得た。

上記のようにして得たpCIBD28N145由来のDde I (平垣末雄) - Aat II断片(約0.2Kb) 約0.1μg、PAS28由来のAat II-Xho I断片(約0.8Kb) 約0.1μg、pSE1PA1SE1dhfr1-9A由来のSma I-Xho I断片(約8.7Kb) 約1μgを30μlのT4 DNAリガーゼ緩衝液に溶かし400単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、Ap耐性株を得た。該形質転換株よりプラスミドを単離し、制限酵素切断による構造解析を行った結果、目的の構造を有するプラスミドDNA、pASN145を得た。プラスミドpASN145を含む微生物はEscherichia coli BASH145 FERM BP-2071として昭和63年9月24日付で農工研に寄託してある。該プラスミドがコードするポリペプチド(hG-CSF誘導体)は、成熟型hG-CSFと比べて以下のようにアミノ

酸残基が置換されている。

アミノ酸置換の位置 (hG-CSFのアミノ酸)	プラスミド
	pASN145
1番目 (Thr)	Ala
3番目 (Leu)	Thr
4番目 (Gly)	Tyr
5番目 (Pro)	Arg
17番目 (Cys)	Ser
145番目 (Gln)	Asn
147番目 (Arg)	Ser

pASN145がコードするポリペプチド(hG-CSF誘導体)を以後hG-CSF [ND28N145]と呼ぶ。

実施例4

hG-CSF [ND28]、hG-CSF [ND28N8]、hG-CSF [ND28N145] およびhG-CSFの動物細胞による生産:

(1) PAS28を保有する動物細胞によるhG-CSF [ND28] の生産:

PAS28のdhfr欠損CHO株への導入はリン酸カルシウム法に準じて行った。すなわち、PCS10%と7.5%NaHCO₃ 溶液[フロ・ラボラトリーズ (Flow Laboratories) 社製] 1/50量を加えたMEM ALPHA培地(リボ核酸およびデオキシリボ核酸含有: ギブコ・オリエンタル社製)[以下、この培地をMEMα(非選択培地)と略記する] 5mlに1×10⁶細胞/mlになるように細胞を接種し(培養には直径8cmのディッシュを使用した: LUX社製(以下、培養にはLUX社のディッシュを用いた))、37℃、CO₂インキュベーターにて1日間培養した。一方、PAS28の10μgを450μlの10mM Tris-HCl (pH7.5) 溶液に溶解し、この溶液に500μlの280mM NaCl、1.5mM Na₂HPO₄、50mM HEPES (N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸) (pH7.1) を含む溶液を加えて混合した。さらに50μlの2.5M CaCl₂ 溶液を加えて混合し、

室温で5分間置した。このDNA溶液全量を、地を除き新しいMEM α (非選択培地) 10mlを加えてさらに1時間培養したdhfr欠損CHO株に添加し、8時間インキュベートした。PBSで細胞を洗浄し、5mlのMEM α (非選択培地)を加えて18時間培養した。細胞をPBS (NaCl 8g/l、KCl 0.2g/l、Na₂HPO₄ (無水) 1.15g/l、KH₂PO₄ 0.2g/l) で洗浄し、0.05%トリプシン、0.02% EDTA (エチレンジアミン4酢酸)を含む溶液3mlを加え、余分の溶液を除いた後、37℃に5分間インキュベートした (トリプシン処理)。透析PCS (ギブコ・オリエンタル社製) を10%、7.5% NaHCO₃溶液を1/50量、100×非必須アミノ酸溶液を1/100量、G418 (ギブコ・オリエンタル社製) を0.3mg/mlになるように加えたMEM ALP HA培地 (リボ核酸およびデオキシリボ核酸不含有) 【以下、この培地をMEM α (選択培地)と略記する】を加えてよく細胞を懸濁し、直径

10cmのディッシュを用い、37℃、CO₂インキュベーターにて5日間培養した。PBSで細胞を洗浄し、MEM α (選択培地)を加えて5日間培養した。同様の操作をして、さらに5日間培養した。PBSで細胞を洗浄した後、トリプシン処理し、10mlのMEM α (選択培地)を加えて細胞を懸濁し、直径6cmのディッシュを用い、37℃、CO₂インキュベーターにて3~7日間培養した。出現してきたコロニーをトリプシン処理した後、50nMのメソトレキセート (以下、MTXと略記する)を含む10mlのMEM α (選択培地)を用いて細胞濃度 5×10^4 /mlになるように直径10cmのディッシュ1枚に植え込んだ。5日おきに上記培地を用いて培地の交換を計3回行った。出現してきたMTX耐性のコロニーを単コロニー分離し、各々直径6cmのディッシュを用い、コンフルエントになるまで培養した。その後、PCSを含まないMEM α (選択培地)に交換し、2日後、培養液中のhG-CSF [ND28]の生産量を調べた

ところ、クローンNo.22が最も多く、そのhG-CSF [ND28]生産量は10 μ g/10⁶細胞・2日であった。このクローンを、100mlの50nM MTXを含むMEM α (選択培地)を含むファルコン (Falcon) 3027型ローラー・ボトルで培養し、コンフルエントになった後、PCSを除去した上記培地を用い、3日間培養した。この100mlの培養液は実施例5で用いた。

(2) pASN6を保有する動物細胞によるhG-CSF [ND28N6]の生産:

pASN6およびdhfr欠損CHO細胞株を用いて、上で述べた手順と同様の手順で、hG-CSF [ND28N6]を生産する細胞株を得た。この中でクローンNo.16の生産量が最も多く、その生産量は7 μ g/10⁶細胞・2日であった。このクローンを、100mlの50nM MTXを含むMEM α (選択培地)を含むファルコン3027型ローラー・ボトルで培養し、コンフルエントになった後、PCSを除去した上記培地を用い、3日間培養した。この100mlの培養液は実施例

5で用いた。

(3) pASN145を保有する動物細胞によるhG-CSF [ND28N145]の生産:

pASN145およびdhfr欠損CHO細胞株を用いて、上で述べた手順と同様の手順で、hG-CSF [ND28N145]を生産する細胞株を得た。この中でクローンNo.9の生産量が最も多く、その生産量は7 μ g/10⁶細胞・2日であった。このクローンを、100mlの50nM MTXを含むMEM α (選択培地)を含むファルコン3027型ローラー・ボトルで培養し、コンフルエントになった後、PCSを除去した上記培地を用い、3日間培養した。この100mlの培養液は実施例5で用いた。

(4) pAS3-3を保有する動物細胞によるhG-CSFの生産:

参考例10で得られたpAS3-3およびdhfr欠損CHO細胞株を用いて、上で述べた手順と同様の手順で、hG-CSFを生産する細胞株を得た。この中でクローンNo.5の生産

量が最も多く、その生産量は10 μ g/10⁶細胞・2日であった。このクローンを、100mlの50nM MTXを含むMEM α (選択 地) を含むファルコン3027型ローラー・ボトルで培養し、コンフルエントになった後、FCSを除去した上記培地を用い、3日間培養した。この100mlの培養液は実施例5で用いた。

実施例5.

hG-CSPの糖鎖導入型誘導体、hG-CSP [ND28]、hG-CSP [ND28N8] およびhG-CSP [ND28N145] のプロテアーゼ抵抗性とhG-CSP [ND28N8] の熱安定性に関する検討

(1) 糖鎖付加の確認

実施例4で得た天然型hG-CSP、hG-CSP [ND28]、hG-CSP [ND28N8] あるいはhG-CSP [ND28N145] を含有する無血清培養液から、遠心により細胞を完全に除去した後、各サンプル15 μ lをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(レムリ

(Laemmli): ネイチャー (Nature) 227, 680

(1970)) に供した。この際、プラスミドDNAを含まないCHO細胞の培養上清と、大腸菌で生産、精製したhG-CSPおよびhG-CSP [ND28] (参考例16参照) も合わせてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。泳動後ゲルを銀染色(和光純薬社製の銀染色キットを使用)したパターンを第8(1)図に示す。一方、同一ゲル上の蛋白質をニトロセルロース膜に移した後、抗hG-CSP単クローン抗体を用いて酵素抗体染色(田部一史、細胞工学、2, 1061(1983))を行ったものが第8(2)図である。抗hG-CSP単クローン抗体は、花井らの方法[花井ら: キャンサー・リサーチ (Cancer Res.), 46, 4438 (1986)]に従って調製したものをを用いた。

天然のhG-CSPあるいはCHO細胞で生産されるhG-CSPは、N末端より第133番目のThr残基にO-グリコシル結合型糖鎖が1本付加することが知られている。またその

とき付加する糖鎖には、シアル酸を1個含むものと2個含むものの2種があることも知られている[大枝ら: ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 103, 544(1988)]。本研究においても、同様にCHO細胞で生産したhG-CSPにはO-グリコシル結合型糖鎖が一本付加していた。また付加する糖鎖には、シアル酸を1個含むものと2個含むものが存在していた。第8(1)図または第8(2)図で見られるhG-CSPの2本のバンドはシアル酸の数の違いによるものである。

これに対しCHO細胞で生産されたhG-CSP [ND28] には、O-グリコシル結合型糖鎖が1つ付加したものに加え2本付加したものも存在していることが判明した。また、hG-CSP [ND28] にN-グリコシレーション結合部位を新たに導入したhG-CSP [ND28N8] およびhG-CSP [ND28N145] では、ともに生産される全hG-CSPの約 1/3 にN-グリコシル結合型糖鎖が付加していた。

その際、hG-CSP [ND28N145] においては、hG-CSP [ND28] の場合と同様に、新たなO-グリコシル結合型糖鎖が付加されたものも存在していた。したがってhG-CSP [ND28N145] の場合、付加する糖鎖の種類と数の違いにより4種のポリペプチドが存在している。すなわち、天然型と同様に一本のO-グリコシル結合型糖鎖が付加したもののほか、O-グリコシル結合型糖鎖が2本付加したもの、O-グリコシル結合型糖鎖が1本、N-グリコシル結合型糖鎖が1本付加したものおよびO-グリコシル結合型糖鎖が2本、N-グリコシル結合型糖鎖が1本付加したものも存在している。一方、hG-CSP [ND28N8] には、新たなO-グリコシル結合型糖鎖の付加はほとんどない。

なお、N-グリコシル結合型糖鎖が付加していることは、N-グリコシル結合型糖鎖とポリペプチドの結合部分を切断する酵素であるN-グリコナーゼ(生化学工業)で処理することに

より確認した。O-グリコシド結合型糖鎖の場合、O-グリカナーゼおよびシアリダーゼ(ともに生化学工業)を用いて確認した。第8図は、第8図の模式図であり、各々のバンドが有する糖鎖の種類と数について記してある。

(四) プロテアーゼ抵抗性の検討

前項で示したように、CHO細胞で生成したhG-CSP [ND28]、hG-CSP [ND28N6] およびhG-CSP [ND28N145] には、各々新たな糖鎖が付加したものと付加しないものが存在していた。そこで新たな糖鎖が付加したものと付加しないものを両方含んでいる前項の培養上清に直接キモトリプシンを加えることにより、糖鎖の付加の有無によるプロテアーゼ抵抗性を比較した。hG-CSP [ND28]、hG-CSP [ND28N6] およびhG-CSP [ND28N145] を各々含有する前項の培養上清450μlに0.5mg/mlのキモトリプシン[シグマ(Sigma)社製]を各々2μl加え、37℃で保温した。キモトリプシンを

添加後10、20、30、60、120、180分後に60μずつ採取し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動用の緩衝液[0.25M Tris-HCl (pH6.8)、8%ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)、40%グリセロール、0.004%ブロムフェノールブルー)を20μl添加することにより反応を停止させた。またキモトリプシンを添加しないサンプルも調製し、これをキモトリプシン添加後0分の試料とした。

次に各試料20μlをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、その後ニトロセルロース膜にポリペプチドを移した後、前項と同様にして酵素抗体染色を行った。その結果、hG-CSP [ND28]、hG-CSP [ND28N6]、hG-CSP [ND28N145] のいずれの場合においても、新たな糖鎖の付加したものは添加しないものに比べてキモトリプシン抵抗性になっていることが判明した。

hG-CSP [ND28] においてはO-グ

リコシド結合型糖鎖が1本付加しているもの(天然型)よりは2本付加しているものの方がキモトリプシン抵抗性になっていた[第8(四)図]。またhG-CSP [ND28N6] の場合、N-グリコシド結合型糖鎖が新たに付加したものが付加していないものより抵抗性になっていた[第8(四)図]。hG-CSP [ND28N145] の場合は、O-グリコシド結合型糖鎖を1本もつもの(天然型)と、O-グリコシド結合型糖鎖が新たに1本付加したものの、N-グリコシド結合型糖鎖が新たに付加したものの、および両方が新たに付加したものの4種のポリペプチドが存在しているが、この場合もN-グリコシド結合型糖鎖が新たに付加したもののほうが抵抗性になっていた。また、N-グリコシド結合型糖鎖に加えO-グリコシド結合型糖鎖が新たに付加したものではさらに抵抗性になっていた[第8(四)図]。

(四) 熱安定性に関する検討

実施例4図で、hG-CSP [ND28

N6] を含有する無血清培養液5μlをセルカット-10(ミリポア社製)を用いて500μlに濃縮した。次に、そのうちの100μlをSuperose 12カラム(ファルマシア社製)(1cm×30cm)に通塔し、N-グリコシド結合型糖鎖の付加したhG-CSP [ND28N6] のみを分離した。クロマトグラフィーには、0.1M Tris-HCl (pH8.0)、0.2M NaCl、1mM EDTAを含む緩衝液を使用した。通塔は0.5μl/minで行った。上記クロマトグラフィーを3回繰り返して、N-グリコシド結合型糖鎖の付加したhG-CSP [ND28N6] を含む溶液(hG-CSP濃度は約1.7μg/ml)を約1.5μl得た。この溶液350μlに、1% Tween 20を3.5μlとN-グリカナーゼ(生化学工業社製)を1μl(0.25Units)加え、37℃で17.5時間反応を行い、N-グリコシド結合型糖鎖の除去を行った。また、N-グリカナーゼのかわりに滅菌水を1μl加えたものも同時に調製し、同様に反応に供した。反応

終了後両反応液の一部を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動に供し、その後銀染色を行うことにより、N-グリカナーゼ処理したサンプルにおいては、N-グリコシル結合型糖鎖が除去されていることを確認した。

上記の両反応液は、反応終了後直ちに 56℃での熱安定性の比較の實驗に使用した。各反応液 60 μ l を 56℃に保温し、0、30、120、240、360 分後に 10 μ l ずつサンプリングを行い、マウスの骨髓造血幹細胞を用いたコロニー形成試験により hG-CSP 活性を測定した。その結果を第 8 図に示す。図中の活性は、37℃で 17.5 時間保温した後の活性を 100% とした時の残存活性で示してある。なお、37℃で 17.5 時間保温後の活性は、保温前の活性を 100% としたとき、N-グリカナーゼ処理したものでは 48.1%、コントロールでは 86.8% であった。

第 8 図に示したように、N-グリコシル結合型糖鎖の付加した hG-CSP (ND28N

8) (コントロール) は同糖鎖を除去した hG-CSP (ND28N8) (N-グリカナーゼ処理) よりも熱に対して安定であることが判明した。

実施例 6.

UK-S1 発現プラスミド pSE1UKS1-1d の造成:

(1) 鋳型 1 本鎖 DNA (1 本鎖 pUKmpS1) の造成:

参考例 2 で得た約 3 μ g の pUK1 を 30 μ l の Y-100 緩衝液に溶かし、制限酵素 Pst I と BamHI をそれぞれ 10 単位ずつ加え、37℃で 2 時間消化反応を行った。65℃、10 分間の熱処理後、AFT 法 [バイオテクニクス (BioTechniques) 2, 66-67 (1984)] を用いて 890 bp の Pst I-BamHI DNA 断片を精製した。

一方、M13 ファージベクターである M13 mp18 RP DNA (宝酒造社製) 約 1 μ g を全量 30 μ l の Y-100 緩衝液に溶かし、制限

酵素 Pst I と BamHI とをそれぞれ 10 単位ずつ加え、37℃で 2 時間消化反応を行った。65℃、10 分間の熱処理後、AFT 法を用いて約 7.2 Kb の DNA 断片を精製した。

このようにして得られた pUK1 由来の 890 bp の DNA 断片と M13 mp18 RP 由来の約 7.2 Kb の DNA 断片を全量 20 μ l の T4 リガーゼ緩衝液に溶かし、300 単位の T4 DNA リガーゼを加え、4℃で 18 時間結合反応を行った。

次に、公知の方法 [メッシング (Messing) ら: メソッド・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology) 101, 20 (1983)] に従い、上記反応液を用いて大腸菌 JM105 株をトランスフェクションし、組換え体ファージを得た。続いて、公知の方法 [上記文献] に従い、この組換え体ファージを大腸菌 JM105 株に感染させた後、培養液から 1 本鎖ファージ DNA を回収した。また、培養液より、プラスミド DNA 回収法に じて、2 本鎖ファージ DNA を回

収した。この 2 本鎖ファージ DNA (pUKmpS1) の構造は制限酵素消化により確認した (第 9 図参照)。

(2) オリゴヌクレオチドを用いた UK-cDN A への変異の導入:

(A) 変異導入用合成 DNA の調製とリン酸化:

UK の 184 番目のアミノ酸残基 Phe を Asn に変え、糖鎖を付加した UK 誘導体 (この UK 誘導体を以下、UK-S1 と略記する) を製造するため、17 塩基の合成 DNA 5'-GGGGAAGAAAACACCACC-3' をアプライド・バイオシステムズ社 380 A・DNA 合成機を用いて合成した。

次にこのようにして得られた合成 DNA 25 ピコモル (picoles) を 10 μ l の 50 mM Tris-HCl (pH 7.6)、10 mM MgCl₂、5 mM DTT、0.1 mM EDTA、0.5 mM ATP を含む溶液中で、5 単位の T4 DNA キナーゼ (宝酒造社製) を加え、37℃で 30 分間反応させることにより、5' 末端をリン酸化し

た。

(B) 2種のオリゴヌクレオチド・プライマーを用いる部位特異的変異の導入：

上で得られた1本鎖の組換えファージDNA 6.5 μ l (約2 μ gのDNAを含む) と1 μ lの10倍濃度のポリメラーゼ緩衝液 (500 mM Tris-HCl (pH 7.8)、70 mM MgCl₂、80 mM 2-メルカプトエタノール、0.25 mM dATP、0.25 mM dCTP、0.25 mM dGTPおよび0.25 mM dTTPを含む) と上記で得られた変異導入用合成DNA 2 μ l (25ピコモル) を混合した溶液を65℃に5分間、55℃に5分間、37℃に10分間、25℃に10分間放置した後、3単位の大腸菌DNAポリメラーゼI・クレノー (Klenow) 断片 (宝酒造社製) (以下、クレノー断片と略記する) を加え、25℃で30分間反応させた。次いで、この反応液に、1 μ lの10倍濃度のポリメラーゼ緩衝液と0.5 pmole/ μ lのM13プライマーM4 (宝酒造社

法を用いて約1.0 KbのAat II-Pst I断片を精製した。別に参考例12で得られたpUKB101プラスミドDNA約3 μ gを30 μ lのY-50緩衝液に溶かし、10単位のAat IIと10単位のEcoRIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用い、約2.9 KbのAat II-EcoRI断片を精製した。

このようにして得られたpUK11由来のAat II-Pst I断片 (約0.05 μ g) とpUKB101由来のAat II-EcoRI断片 (約0.1 μ g) と変異を導入した約600 bpのPst I-EcoRI断片とを20 μ lのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、300単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌C600 SP8株 [プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA 72,

製) 6 μ lと3単位のクレノー断片を加え、37℃で10分間、25℃で40分間反応させた後、10 mM ATPを2 μ lと300単位のT4 DNAリガーゼを加え、11℃で18時間結合反応を行った。この反応液に対して、フェノール抽出とクロロホルム抽出を行った後、エタノール沈澱によってDNA断片を回収した。このDNA断片を全量30 μ lのY-100緩衝液に溶かし、12単位のEcoRIと12単位のPst Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約8.00 bpのPst I-EcoRI断片を精製した。

(C) 変異を導入したDNA断片のベクターへの組み込み

参考例3で得られたpUK11プラスミドDNA約3 μ gを30 μ lのY-50緩衝液に溶かし、10単位のAat II (東洋紡績社製) と8単位のPst Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT

3418 (1975)] を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からコロニーハイブリダイゼーション法を用いて、変異導入用合成DNA (上述) の5'末端を³²Pで放射能標識したプローブとハイブリダイズする組換えプラスミドpUKS1を単離した。制限酵素消化による構造解析およびM13ファージを用いたディデオキシ・シーケンス法により、pUKS1が目的の構造を有することを確認した (第10図参照)。例 UK-S1発現プラスミドpSE1UKS1-1dの造成：

参考例9で得られたpSB1PAIS1d hfr1-9A プラスミドDNA約2 μ gを30 μ lのY-0緩衝液に溶かし、10単位のKpn Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。続いて1.5 μ lの2M NaClと10単位のXho Iを加え、さらに37℃で1時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約8.6 KbのDNA断片を精製した。また、pSB1UKprol-1A プラスミドDNA約3 μ gを30 μ lのY

—100緩衝液に溶かし、12単位のBgl IIと12単位のXho Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約0.75 KbのDNA断片を精製した。一方、上で得られたpUKS1プラスミドDNA約3μgを30μlのY-0緩衝液に溶かし、15単位のKpn Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。続いて1.5μlの2M NaClと12単位のBgl IIを加え、さらに37℃で1時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約1.15 KbのDNA断片を精製した。

このようにして得られたpSEI PAISE1dhfr1-9A由来の約8.8 KbのDNA断片(約0.1μg)、pSEI UKpro1-1A由来の約0.75 KbのDNA断片(約0.02μg)、およびpUKS1由来の約1.15 KbのDNA断片(約0.02μg)を全量20μlのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、100単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

社製) 1/50量を加えたMEMα(非選択培地) 5mlに 1×10^5 細胞/mlになるように細胞を接種し(培養には直径6cmのディッシュを使用した: LUX社製(以下、培養にはLUX社のディッシュを用いた))、37℃、CO₂インキュベーターにて1日間培養した。一方、pSEI UKS1-1d DNA 10μgを450μlの10mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液に溶解し、この溶液に500μlの280mM NaCl、1.5mM Na₂HPO₄、50mM HEPES (N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸) (pH 7.1)を含む溶液を加えて混合した。さらに50μlの2.5M CaCl₂溶液を加えて混合し、室温で5分間静置した。このDNA溶液全量、培地を除き新しいMEMα(非選択培地) 10mlを加えてさらに1日間培養したdhfr欠損CHO株に添加し、8時間インキュベートした。PBSで細胞を洗浄し、5mlのMEMα(非選択培地)を加えて18時間培養した。細胞を

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換からプラスミドDNA、pSEI UKS1-1dを単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、pSEI UKS1-1dは目的の構造を有することを確認した(第11図参照)。

プラスミドpSEI UKS1-1dを含む微生物はEscherichia coli BUXS1-1d PERM BP-2072として昭和63年9月24日付で農工研に寄託してある。

実施例7.

UK-S1およびpro-UKポリペプチドの動物細胞による生産:

(i) pSEI UKS1-1dを保有するCHO細胞によるUK-S1ポリペプチドの生産:

実施例6で得られたpSEI UKS1-1dのdhfr欠損CHO株への導入はリン酸カルシウム法に準じて行った。すなわち、FCS 1/10量および7.5% NaHCO₃溶液(Flow Laboratories

PBS (NaCl 8g/l、KCl 0.2g/l、Na₂HPO₄(無水) 1.15g/l、KH₂PO₄ 0.2g/l)で洗浄し、0.05%トリブリン、0.2% EDTA (エチレンジアミン四酢酸)を含む溶液3mlを加え、余分の溶液を除いた後、37℃に5分間インキュベートした(トリブリン処理)。選析FCS(ギブコ・オリエンタル社製)を10%、7.5% NaHCO₃溶液を1/50量、100×非必須アミノ酸溶液を1/100量、G418(ギブコ・オリエンタル社製)を0.3μg/mlになるように加えたMEMα(選択培地)を加えてよく細胞を懸濁し、直径10cmのディッシュを用い、37℃、CO₂インキュベーターにて5日間培養した。PBSで細胞を洗浄し、MEMα(選択培地)を加えて5日間培養した。同様の操作をして、さらに5日間培養した。PBSで細胞を洗浄した後、トリブリン処理し、10mlのMEMα(選択培地)を加えて細胞を懸濁し、直径8cmのディッシュを用い、37℃、CO₂インキュベーターにて3

～7日間培養した。出現してきたコロニーをトリプシン処理した後、50 nMのMTXを含む10 mlのMEM α (選択培地)を用いて細胞濃度 5×10^4 / mlになるように直径10 cmのディッシュ1枚に植え込んだ。5日おきに上記培地を用いて培地の交換を計3回行った。出現してきたMTX耐性のコロニーを単コロニー分離し、各々直径8 cmのディッシュを用い、コンフルエントになるまで培養した。5 mlの50 nM MTXを含むMEM α (選択培地)に交換し、1日後培養液中のUK-S1の活性をフィブリン・プレート・アッセイ法 [Granelli-PipernoとReich: ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン (J. Exp. Med.) 148, 233 (1978)]を用いて調べた。その結果、クローンNo.12の活性が最も高く、そのUK-S1の生産量は $5 \mu\text{g} / 10^4$ 細胞・日であった。このクローンを100 mlの50 nM MTXを含むMEM α (選択培地)を含むファルコン (Falcon) 3027型ローラー・ボトルで培養し、コンフルエントになった後、

実施例8

天然型 pro-UKと糖鎖付加型修飾UK-S1のトロンビンに対する感受性の比較:

(A) pro-UKとUK-S1のCHO細胞培養液からの精製:

実施例7で得た天然型の pro-UKあるいは糖鎖付加型修飾UK-S1を含有する無血清培養液それぞれ100 mlに対して0.05% Tween (Tween) 80と0.05% NaN₃を含む50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.5) [以下PBS-TAと略す]で平衡化した5 mlのグンク (Zn)-キレートセファロース (Sephacrose) (ファルマシア・ジャパン株式会社 (Pharmacia Fine Chemicals) 製) を添加し、4℃で1時間以上穏やかに混合した。この混合液をバイオラッド (Bio Rad) 社製のエコノカラムにつめた。

各カラムを10ベッド体積の10 KU/mlアプロチニンを含むPBS-TAで洗浄した後、10 KU/mlアプロチニンと50 mMイミダゾール (imidazole)を含むPBS-TAで抽出を行

PCSを除去した10 KU/mlアプロチニン (ペーリンガー・マンハイム社) を含む上記培地を用い、3日間培養した。この100 mlの培養液は実施例8で用いた。

(B) pSE1UK pro1-1Aを保有する動物細胞による pro-UKポリペプチドの生産:

参考例13で得られた組換え体プラスミド pSE1UK pro1-1AとpSV2-dhfrおよびdhfr欠損CHO細胞株を用いて、上で述べた手順と同様の手順で pro-UKを生産する細胞株を得た。この中でクローンNo.5の活性が最も高く、その pro-UKの生産量は $3 \mu\text{g} / 10^4$ 細胞・日であった。このクローンを、100 mlの50 nM MTXを含むMEM α (選択培地)を含むファルコン3027型ローラー・ボトルで培養し、コンフルエントになった後、FCSを除去した10 KU/mlアプロチニン (ペーリンガー・マンハイム社) を含む上記培地を用い、3日間培養した。この100 mlの培養液は実施例8で用いた。

この抽出液について上述のフィブリン・プレート・アッセイ法によりウロキナーゼ蛋白質の有無を調べ、ウロキナーゼ蛋白質を含む画分を集めた。この溶液に対して、PBS-TAで平衡化した5 mlのSP-セファデックス (Sephadex) C50 [ファルマシア・ジャパン株式会社 (Pharmacia Fine Chemicals) 製] を添加し、4℃で1時間以上穏やかに混合した。この混合液をミニカラム (生化学工業社製 セパコール・ミニ) に充填した。カラムを10ベッド体積のPBS-TAで洗浄した後、3ベッド体積の500 mM NaClを含むPBS-TAで抽出した。

次に、直ちにこの抽出液に対して、PBS-TAで平衡化した1 mlのベンザミジン (Benzamidino)-セファロース (Sephacrose) 6B (ファルマシア・ジャパン株式会社製) を添加し、4℃で1時間以上、穏やかに混合した。この混合液をミニカラム (生化学工業社製 セパコール・ミニ) につめ、蒸留画分を集めた。この蒸留画分

には、1本鎖の天然型 pro-UKあるいは1本鎖のUK-S1が含まれていた。

UK-S1に新たなN-グリコシド結合型糖鎖が付加していることは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて天然型 pro-UKとUK-S1を解析したときに、UK-S1の方が天然型 pro-UKよりも分子量が大きいこと、および天然型 pro-UKとUK-S1をN-グリコナーゼで処理することにより、両者の分子量が減少しほぼ同一になることにより確認した。

④ 精製した天然型 pro-UKおよびUK-S1のトロンビン感受性テスト：

上で得られた天然型 pro-UKおよびUK-S1を含む溶液をフィブリン・プレート・アッセイ法を用いてウロキナーゼ活性として1000 IU/mlとなるように300 mM NaClを含むPBS-TAで希釈した。この希釈液2.16 μlに24 μMヒト・トロンビンを36 μl添加し、37℃で保温した。ヒト・トロンビンはシグマ

(Sigma)社製のものを用いた。また、ヒト・トロンビンは298 IUのトロンビンに対して100 IUのアプロチニンを加え、37℃で一時間反応させた標準品を用いた。トロンビンを添加した後、15、30、60、120分後に83 μずつサンプリングし、24 μMのトロンビン阻害剤(Thrombop-American Diagnostica社製)を9 μl加え、反応を停止させた。また、トロンビン添加後、直ちにトロンビン阻害剤を加えたサンプルも調製した(これをトロンビン添加後0分のサンプルとした)。また、対照群としてトロンビンを添加していないものを37℃で保温した。

次に、各試料22.5 μlをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動[レムリ(Lacmli):ネイチャー(Nature) 227,680(1970)]に供することにより、1本鎖のウロキナーゼ(誘導体)が2本鎖になったかどうか調べた。その結果、天然型 pro-UKに比べてUK-S1の方が2本鎖になる割合が少ないことが判明した(直

12図参照)。この結果はUK-S1の方がトロンビンに対する感受性が低いことを示す。

さらに、この結果を確認するため、S-2444アミドリティック(asidolytic)活性の測定を行った。すなわち、上記の試料をTNT緩衝液[0.5 M Tris-HCl (pH 7.4)、0.38 M NaCl、0.1% Tween 80]で5倍希釈したもの50 μlに、10 μMヒト・プラスミン(Plasmin)を50 μl加え、37℃で30分間反応させた。ヒト・プラスミンはベーリンガー・マンハイム社製のものを用いた。次に、発色基質S-2444[1.2 mM; カビ(Kabi Vitrum)社製]を50 μl添加し、さらに37℃で90分間反応させた後、405 nmの吸光度を測定し、アミドリティック活性を算出した。その結果を第13図に示す。

第13図に示したように、UK-S1は天然型 pro-UKに比べ、トロンビンに対する感受性が低いことが判明した。

実施例9.

天然型 pro-UKと糖鎖付加型修飾UK-S1のin vivo 評価：

(1) 持続注入(Infusion)による実験：

生後4〜6ヶ月の雄ビーグル犬(体重5.5〜11.5 kg)を用いた。39 mg/kgのベントバルビタールナトリウムの静脈内投与により麻酔し、室内空気による人工呼吸を施した。実施例8-①の方法で得た天然型 pro-UKおよび糖鎖付加型修飾UK-S1を大腿静脈より30分間(2000 U/kg/分)持続注入し、投与前(0分)、投与開始後15、30、45、60、90分の各時点において大腿動脈より採血した。採血した血液は直ちに遠心分離して血漿を得、測定まで-20℃で凍結保存した。得られた血漿を用い、実施例9-④に従い全身線溶系因子の測定を行った。その結果、糖鎖付加型修飾UK-S1は天然型 pro-UKと同様にほとんど全身線溶系因子を活性化しないことがわかった(第45図参照)。また、ウロキナーゼに

対する抗体を用いたサンドイッチ型の酵素免疫測定法により、天然型 pro-UK および糖鎖付加型酵素 UK-S1 の血漿中濃度の測定を行ったところ、天然型 pro-UK の血漿中からの消失半減期が 12.0 分であったのに対し、糖鎖付加型酵素 UK-S1 では 24.2 分であり、消失半減期の延長が認められた。また、このときの血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC) については糖鎖付加型酵素 UK-S1 の AUC は天然型 pro-UK の AUC の約 3.6 倍であった〔第 8 表-(A) 参照〕。

(2) 急速静注 (bolus) 投与による実験：

雄雄の雄雄犬 (体重 4.6 ~ 13.0 kg) を用いた。上と同様に準備した犬の大動脈を約 5 cm にわたって露出し、その最も中脈に近い所に電磁血流計を装着した。分岐を含む動脈の一部 (約 1 cm) の前後を結紮して血流のない小部分を作り、分岐から 1000 U/μl のトロンビン (ミドリ十字) を 0.2 ~ 0.4 ml 注入してこの部分に血栓を作製した。血栓生成の有無は血流

糖鎖付加型酵素 UK-S1 では 48.1 分であり、消失半減期の延長が認められた。さらにこのときの AUC は天然型 pro-UK の約 5.6 倍であった〔第 8 表-(B) 参照〕。

(3) 全身線溶系因子への影響の検討：

全身線溶系因子として、α2-プラスミンインヒビター、プラスミノゲン、フィブリノーゲンの 3 項目について測定を行った。

すべての項目の被検血漿は、全血漿 9 容に 3.8% タンパク 1 容を加えたものを 3000 回転/分で 10 分間遠心した上清として得た。これに加えて、α2-プラスミンインヒビター、プラスミノゲン測定用血漿には最終濃度 12.5 μM の PPACK (0-phenyl alanyl-L-prolyl-L-arginine chloromethyl ketone, CALBIOCHEM®、Lot 586042, Hoechst) を、またフィブリノーゲン測定用血漿には 250 U/μl のアプロチニン (トラジロール®、バイエル) を添加した。

測定はオリンパス社製、オートアナライザー AU510 を用いた。試薬は α2-プラスミン

量の増減によって判断した。血栓生成後、最低 1 時間 (1 ~ 1.5 時間) 放置し、自然溶解が起こらないことを確認した。天然型 pro-UK および糖鎖付加型酵素 UK-S1 (0.6 mg/kg) は 3 分間の急速静注とし、投与前 (0 分)、投与開始後 15、30、45、60、90、120 分の各時点において採血した。

その結果、天然型 pro-UK では図 2 の例について血栓の再開通が認められなかったのに対し、糖鎖付加型酵素 UK-S1 を投与した犬 3 例全てに再開通が認められた。このときの全身線溶系因子の測定を行ったところ、天然型 pro-UK では全身線溶系因子の活性化傾向が見られたのに対し、糖鎖付加型酵素 UK-S1 では、infusion の場合と同様に全身線溶系因子の活性化は認められなかった (第 4 図参照)。

また同時に、天然型 pro-UK および糖鎖付加型酵素 UK-S1 の血漿中濃度の測定を行ったところ、天然型 pro-UK の血漿中からの消失半減期が 30.3 分であったのに対し、糖

インヒビター、プラスミノゲンの定量には三共の ALP オートカラー三共をそれぞれ用い、フィブリノーゲンの定量には国際試薬のフィブリノーゲン試薬を用いた。

第 8 表

天然型 pro-UK および糖鎖付加型酵素 UK-S1 の血中半減期

(A) 持続注入 (ビーグル犬)

	T1/2 (min)	AUC (μg · min/ml)
pro-UK	12.0 ± 1.9	60.2 ± 13.4
UK-S1	24.2 ± 10.0	214 ± 57.6

(B) 急速静注 (雄犬)

	T1/2 (min)	AUC (μg · min/ml)
pro-UK	30.3 ± 8.9	98.8 ± 38.1
UK-S1	48.1 ± 2.0	555 ± 118

実施例 10.

糖鎖付加型酵素 UK-S3 をコードする組換えプラスミド pUKS3 の作成：

実施例6の(2)-(C)で得られたpUKS1プラスミドDNA約2 μ gを30 μ lのY-100緩衝液に溶かし、16単位のCfrIと10単位のHindIIIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約0.75KbのDNA断片を精製した。一方、参考例20で得られたpHPA2プラスミドDNA約2 μ gを30 μ lのY-100緩衝液に溶かし、10単位のHindIIIと1単位のEcoRIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約3.4KbのDNA断片を精製した。下記2種の合成DNA(4.3塩基と4.3塩基)を実施例1に述べた方法に従い、合成および5'末端のリン酸化を行った。

5'-GGC CAA AAG ACT ATT CGA ACG CGT TTT AAG ATT ATT GGG GGA G-3'
3'-TT TTC TGA TAA GCT TGC GCA AAA TTC TAA TAA CCC CCT CTT AA-5'

このようにして得られたpUKS1由来の約0.75KbのDNA断片(約0.1 μ g)、pHPA2由来の約3.4KbのDNA断片(約0.1 μ g)、

2時間消化反応を行った。続いて1.5 μ lの2M NaClと10単位のXhoIを加え、さらに37℃で1時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約8.8KbのDNA断片を精製した。また、pSE1UKproI-1AプラスミドDNA約3 μ gを30 μ lのY-100緩衝液に溶かし、12単位のBglIIと12単位のXhoIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約0.75KbのDNA断片を精製した。一方、上で得られたpUKS3プラスミドDNA約3 μ gを30 μ lのY-100緩衝液に溶かし、15単位のKpnIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。続いて1.5 μ lの2M NaClと12単位のBglIIを加え、さらに37℃で1時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約1.15KbのDNA断片を精製した。このようにして得られたpSE1PA1SE1dhfr1-9A由来の約8.6KbのDNA断片(約0.1 μ g)、

および5'リン酸化された2種の合成DNA(1ピコモルずつ)を全量20 μ lのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、300単位のT4リガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性を得た。この形質転換株からプラスミドDNAを単離し、制限酵素消化による構造解析およびM13ディデオキシ・シーケンス法による塩基配列決定を行い、目的の構造を有し、Leu153→Asn、Pro155→Thrの塩基置換を持つプラスミドDNAをpUKS3と命名した(第47図参照)。本発明で得られたUK-S3のアミノ酸配列を第7表に示す。

実施例11.

UK-S3発現プラスミドpSEUKS3の造成:

参考例9で得られたpSE1PA1SE1dhfr1-9AプラスミドDNA約2 μ gを30 μ lのY-100緩衝液に溶かし、10単位のKpnIを加え、37℃で

pSE1UKproI-1A由来の約0.75KbのDNA断片(約0.02 μ g)、およびpUKS3由来の約1.15KbのDNA断片(約0.02 μ g)を全量20 μ lのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、100単位のT4DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA、pSEUKS3を単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、pSEUS3は目的の構造を有することを確認した(第48図参照)。

プラスミドpSEUKS3を含む大腸菌菌株はEscherichia coli BSEUKS3 (FERM BP-2478)として1989年8月15日付で農工研にデータベース的のもとに寄託してある。

実施例12.

pSEUKS3を保有する動物細胞によるUK-S3ポリペプチドの生産:

実施例11で得られた組換え体プラスミド pSEUKS3およびdhr欠損CHO細胞株を用いて、上で述べた手順と同様の手順で UK-S3を生産する細胞株を得た。この中で クローン13の活性が最も高く、そのUK-S3の生産量は3 μ g/10⁶細胞・日であった。このクローンを、100 μ lの50nM MTXを含むMEM α (選択培地)を含むファルコン3027型ローラー・ボトルで培養し、コンフルエントになった後、FCSを除去した10 KU/ μ gアプロチニン (ペーリンガー・マンハイム社)を含む上記培地を用い、3日間培養した。この100 μ lの培養液は実施例13で用いた。

実施例13

糖鎖付加型修飾UK-S3の熱安定性に対する検討:

実施例8-(D)と同様にしてCHO細胞培養液から糖鎖付加型修飾UK-S3を精製した。精製された天然型pro-UKおよび糖鎖付加型

修飾UK-S3を50mMリン酸、200mM アルギニン、100mM NaCl、0.01% Tween 80、0.05%アジ化ナトリウムから成る緩衝液(pH7.5)に10 μ g/ μ lになるように溶解し、70℃でインキュベートした。インキュベート開始後、1、2、3、4時間目にサンプリングを行い、水中で冷却後直ちにフィブリン・プレート・アッセイを行い、残存活性を測定した(第49図参照)。

糖鎖付加型修飾UK-S3は天然型pro-UKよりも熱に対して安定であることが明らかとなった。

参考例1

ヒト ϵ -PAC DNAを運ぶプラスミドpPA7の造成:

(D) Detroit562細胞よりのポリ(A) RNAの調製:

ヒト喉頭ガン細胞株Detroit562より、チオシアン酸グアニジン-塩化リチウム法 [カサラ (Cathala) ら: ディー・エヌ・エイ (DNA) 2, 329 (1983)] に従い、ポリ(A)を有するRNAを下記のごとく調製した。

ヒト喉頭ガンDetroit562 (ピーターソン・ダブリュ・ディ・ジュニア (Peterson, W. D., Jr.) ら: プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 70, 1187 (1973)) を、10%仔牛胎児血清、100 \times 非必須アミノ酸溶液 (Flow Laboratories 社製) を1/100量、1mMピルビン酸ナトリウム、0.1%ラクトアルブミン水化物 (ギブコ・オリエンタル) を含む50mlのMEM培地 (日本製薬社製) を用い、ティッシュ・カルチャー・フラス

コ (コーニング社製、150 μ l) 内で生育させた。37℃でコンフルエント (confluent) になるまで培養した後、細胞をPBSで洗浄し、100ng/mlのフォルボール・ミリスチート・アセート (PMA: Phorbol myristate acetate) を添加し、仔牛胎児血清を除いた上記培地30mlを加え、さらに37℃で24時間培養した。続いて細胞を0.05%トリブシン、0.02%EDTAを含む溶液10mlで処理し、細胞懸濁液を取得した。6本の上記ティッシュ・カルチャー・フラスコから総計1 $\times 10^6$ の細胞を取得した。細胞懸濁液から、1,100 $\times g$ 、4℃、10分間の遠心によって細胞を集め、80mlのリン酸塩バッファーで洗浄した後、5Mチオシアン酸グアニジン、10mM EDTA、50mM Tris-HCl (pH7) および8% (V/V) 2-メルカプトエタノールからなる溶液10ml中でボルタックス・ミキサーを用い可溶化した。この可溶化物を遠心管に移し、4M LiCl溶液80mlを加えて攪拌した後、4℃で20時間静置した。Hitachi RPR10ローターにて9,000rpm、90分

間遠心後、RNAを沈澱として回収した。RNAの沈澱を4 M尿素および2 M塩化リチウムからなる溶液50mlに懸濁し、Hitachi RPR10 ローターにて9,000rpm、60分間遠心後、再びRNAを沈澱として回収した。RNAの沈澱を0.1%ラウリル硫酸ナトリウム、1 mM EDTA、10 mM Tris-HCl (pH7.5) からなる溶液10mlに溶解し、フェノール-クロロホルムで抽出後、エタノール沈澱により回収した。得られたRNA約2.5 mgを10 mM Tris-HCl (pH8.0) および1 mM EDTA からなる溶液1 mlに溶かした。65℃、5分間インキュベートし、0.1 mlの5 M NaClを加えた。混合物をオリゴ(dT)セルロース・カラム【ビー・エル・バイオケミカル (P-L Biochemical) 社製】クロマトグラフィー (カラム体積0.5 ml) にかけた。吸着したポリ (A) を有するmRNAを10 mM Tris-HCl (pH7.5) および1 mM EDTA からなる溶液で溶出し、ポリ (A) を有するmRNA約90 µgを得た。

② cDNA合成と該DNAのベクターへの挿入:

mMとなるよう加えた溶液 200 µlに加え、さらに81単位のターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (以下TdTと略記する) (P-L Biochemicals 社製) を加えて、37℃、11分間反応させた。ここで、pCDV1のKpnI切断部位の3'末端にポリ (dT) 鎖が約67個付加された。該溶液からフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈澱により、ポリ (dT) 鎖の付加したpCDV1DNA約100 µgを回収した。該DNAを10 mM Tris-HCl (pH7.5)、6 mM MgCl₂、100 mM NaClからなる緩衝液 150 µlに加え、さらに360 単位のEcoRIを加え、37℃2時間反応させた。該反応液をLGT法で処理後、約3.1 kbのDNA断片を回収し、約60 µgのポリ (dT) 鎖付加 pCDV1を得た。該DNAを10 mM Tris-HCl (pH8.0) および1 mM EDTAからなる溶液 500 µlに溶解し、85℃5分間インキュベート後、氷冷して50 µlの5 M NaClを加えた。混合物をオリゴ (dA)セルロースカラム (コラボレイティブリサーチ社製) クロマトグラフィーにかけた。ポリ

オカヤマ・バーグ (Okayama-Berg) の方法

【モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.)、2、181(1982)】に従い、cDNAの合成とそれを組み込んだ組換え体プラスミドの産成を行った。その工程の概略を第14図に示す。

pCDV1【オカヤマ・アンド・バーグ (Okayama & Berg): モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.)、3、280(1983)】400 µgを10 mM Tris-HCl (pH7.5)、6 mM MgCl₂ および10 mM NaClからなる溶液300 µlに加え、さらに500 単位のKpnIを加えて、37℃、6時間反応させ、プラスミド中のKpnI部位で切断した。フェノール-クロロホルム抽出後、エタノール沈澱によりDNAを回収した。KpnI切断した該DNA約200 µgを40 mM カコジル酸ナトリウム、30 mM Tris-HCl (pH8.0)、1 mM CaCl₂ および0.1 mMジチオスレイトール (以下DTTと略記する) からなる緩衝液 (以下TdT緩衝液と略記する) にdTTPを0.25

(dT) 鎖長が充分なものはカラムに吸着し、これを10 mM Tris-HCl (pH8.0) および1 mM EDTAからなる溶液で溶出し、ポリ (dT) 鎖の付加したpCDV1 (以下ベクタープライマーと略記する) 27 µgを得た。

次にリンカーDNAの調製を行った。

pL1【オカヤマ・アンド・バーグ (Okayama & Berg): モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.)、3、280(1983)】約14 µgを10 mM Tris-HCl (pH7.5)、6 mM MgCl₂ および50 mM NaClからなる緩衝液 200 µlに加え、さらに50単位のPstIを加え、37℃4時間反応させ、pL1DNA中のPstI部位で切断させた。該反応物をフェノール-クロロホルム抽出後、エタノール沈澱を行い、PstIで切断したpL1 DNA約13 µgを回収した。該DNA約13 µgをTdT緩衝液に純濃度0.25 mMのdGTPを含む溶液50 µlに加え、さらにTdT (P-L Biochemicals社製) 54単位を加えて37℃13分間インキュベートし、pL1のPstI切断部位3'末

端に(dG)鎖を約14個付加した。フェノール-クロロホルム抽出後エタノール沈澱にてDNAを回収した。該DNA 10mM Tris-HCl (pH7.5)、6mM MgCl₂、および60mM NaClからなる緩衝液 100μlに加え、さらに80単位のHindIIIを加えて37℃ 3時間インキュベートし、pL10NAのHindIII部位で切断した。該反応物をアガロースゲル電気泳動にて分離し、約0.5kbのDNA断片をDEAEペーパー法〔ドレツェン(Dretzen)ら: アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.), 112, 295(1981)〕にて回収し、オリゴ(dG)鎖付きのリンカーDNA (以下単にリンカーDNAと略記する)を得た。

上記で調製したポリ(A)RNA約4μg、ベクタープライマー約1.4μgを50mM Tris-HCl (pH8.3)、8mM MgCl₂、30mM KCl、0.3mM DTT、2mM dNTP (dATP、dTTP、dGTPおよびdCTP)および10単位のリボスクレアーゼインヒビター(P-L Biochemicals社製)からなる溶液22.3μlに溶解し、10単位の逆転写酵素

(生化学工業社製)を加え、41℃ 90分間インキュベートし、mRNAに相補的なDNAを合成させた。該反応物をフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈澱を行い、RNA-DNA二重鎖の付加したベクタープライマーDNAを回収した。該DNAを66μM dCTPおよび0.2 μgポリ(A)を含むTdT緩衝液20μlに溶かし、14単位のTdT(P-L Biochemicals社製)を加えて37℃ 2分間インキュベートし、cDNA 3'末端に20個の(dC)鎖を付加した。該反応物をフェノール-クロロホルム抽出し、エタノール沈澱により(dC)鎖の付加したcDNA-ベクタープライマーDNAを回収した。該DNAを10mM Tris-HCl (pH7.5)、6mM MgCl₂、および60mM NaClからなる液 400μlに溶かし、20単位のHindIIIを加え、37℃ 2時間インキュベートし、HindIII部位で切断した。該反応物をフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈澱して0.5ピコモルの(dC)鎖付加cDNA-ベクタープライマーDNAを得た。該DNA 0.2

ピコモルおよび前記のリンカーDNA 0.4ピコモルを10mM Tris-HCl (pH7.5)、0.1M NaClおよび1mM EDTAからなる溶液 100μlに溶かし、65℃、42℃、0℃でそれぞれ10分、25分、30分間インキュベートした。20mM Tris-HCl (pH7.5)、4mM MgCl₂、10mM (NH₄)₂SO₄、0.1M KClおよび0.1mM β-NADの組成で、全量1000μlとなるよう反応液を調製した。該反応液に25単位の大腸菌DNAリガーゼ(ニュートラングランド・バイオラプス社製)を加え、11℃ 18時間インキュベートした。該反応液を各40μMのdNTP、0.15mM β-NADとなるよう成分を追加調製し、10単位の大腸菌DNAリガーゼ、20単位の大腸菌DNAポリメラーゼI(P-L Biochemicals社製)および10単位の大腸菌リボスクレアーゼH(P-L Biochemicals社製)を加え、12℃、25℃で順次1時間ずつインキュベートした。上記反応で、cDNAを含む組換えDNAの環状化と、RNA-DNA二重鎖のRNA部分がDNAに置換され、完全な二重鎖

DNAの組換え体プラスミドが生成した。

(3) ヒトt-PA・cDNAを含む組換えDNAの選択:

次に、コロニー・ハイブリダイゼーションを用い、ヒトt-PA・cDNA〔ペニカ(Pennica)ら: ナチャー(Nature) 301, 214(1983)〕のt-PAシグナルペプチド領域の一部の塩基配列と一致する塩基の合成DNA 5'-ATGGATGCAATGAAGAGAGGCTCTGCTGT-3'を³²Pで標識したプローブと会合するクローンとして、t-PA・cDNAを以下のようにして選択した。

まず、(2)で得た組換え体プラスミドを用い、大腸菌C800SP8株〔カメロン(Cameron): プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) USA 72, 3418(1975)〕をハナハンの方法〔Hanahan: ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 166, 557(1983)〕に従い形質転換した。られた約

10,000個のコロニーをハナハンとメセルソンの方法 [Hanahan and Meselson: *メソッド・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology)* 100, 333(1983)] に従い、ニトロセルロース・フィルター上に固定した。次に、フィルターのプレハイブリダイゼーションは、 $8 \times \text{NET}$ ($1 \times \text{NET} = 150\text{mM NaCl}$, 15mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM EDTA)、 $10 \times \text{デンハルト}$ (Denhardt) 液、および $100\mu\text{g}/\text{ml}$ の断片化した大腸菌染色体 DNA を含む溶液中、 65°C 、4時間またはそれ以上の時間行った。このプレハイブリダイゼーション溶液に上述の ^{32}P で標識したプローブを加え、フィルター上の DNA と会合させた (65°C 、18時間以上)。次に、フィルターを $8 \times \text{SSC}$ ($1 \times \text{SSC} = 150\text{mM NaCl}$, 15mM タン酸ナトリウム) で2回洗浄し (室温、5分間ずつ)、 65°C の $2 \times \text{SSC}$ と 0.1% SDS を含む液で30分間洗浄した。さらに 65°C の $2 \times \text{SSC}$ と 0.1% SDS を含む液で15分間洗浄した後、 $8 \times \text{SSC}$ で室温で2回洗浄した (5分

間ずつ)。フィルターを空気乾燥した後、オートラジオグラフィーにより陽性クローン1個を同定した。この陽性クローンが持つプラスミド p t P A 7 の c D N A の塩基配列を、M13ファージを用いたディデオキシ・シーケンス法により決定した。その結果、p t P A 7 の c D N A は、ペニカラが報告した t - P A のアミノ酸配列 [Pennica ら: *ネイチャー (Nature)* 301, 214(1983)] と完全に一致する t - P A をコードしていることが判明した。ただし、成熟型 t - P A の95番目のアスパラギン酸のコドン (G A C) と 512番目のスレオニンのコドン (A C A) がそれぞれ G A T、A C C になっていることがわかった。

この菌株は、*Escherichia coli* E t P A 7 F E R M B P - 1467として、敬工研に寄託されている。

参考例2.

ヒト pro-UK c D N A を運ぶプラスミド p U K 1 の造成:

参考例1で作成したDetroit 562細胞のcDNAライブラリーをコロニー・ハイブリダイゼーション法によりスクリーニングし、ヒト pro-UK c D N A クローンを単離した。すなわち、まず、参考例1で得た組換え体プラスミドを用い、大腸菌 C 6 0 0 S P 8 株 [カメロン (Cameron): *プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.)* USA 72, 3416(1975)] をハナハンの方法 [Hanahan: *ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.)*, 166, 557(1983)] に従い形質転換した。得られた約30,000個のコロニーをハナハンとメセルソンの方法 [Hanahan and Meselson: *メソッド・イン・エンザイモロジー (Method in Enzymology)* 100, 333(1983)] に従い、ニトロセルロース・フィルター上に固定した。次に、フィルターのプレハイブリダイゼーションは、 $6 \times \text{NET}$ 、 $10 \times \text{デンハルト}$ (Denhardt) 液、および $100\mu\text{g}/\text{ml}$ の断片化した大腸菌染色体 DNA を含む溶液中、

65°C 、4時間またはそれ以上の時間行った。

次に、ヒト pro-UK c D N A [ホルムズ (Holmes) ら: *バイオテクノロジー (Bio/Technology)* 3, 923(1985)] のクリンゲル領域の一部の塩基配列と一致する41塩基の合成 DNA

5'-GGGAATGGTCACTTTTACCGAGGAAAGGCGCACTGACAC-3'

(本発明者らが単離したヒト pro-UK c D N A についていえば、第5表中の下線を付した塩基配列に相当する) を ^{32}P で標識したプローブを、上のプレハイブリダイゼーション溶液に加え、フィルター上の DNA と会合させた (65°C 、16時間以上)。次に、フィルターを $8 \times \text{SSC}$ で2回洗浄した (室温、5分間ずつ) 後、 $1 \times \text{SSC}$ と 0.1% SDS を含む 57°C の液で30分間洗浄した。さらに $1 \times \text{SSC}$ と 0.1% SDS を含む 57°C の液で15分間洗浄した後、 $8 \times \text{SSC}$ で2回洗浄した (室温、5分間ずつ)。フィルターを空気乾燥した後、オートラジオグラフィーにより陽性クローン1個を同定した。この陽性クローンが持つプラスミド p U K 1 の c D N A

の塩基配列を、M13ファージを用いたディデオキシ・シーケンス法により決定した(第5表)。

その結果、pUK1のcDNAは第5表のpro-UKのアミノ酸残基の番号付けに従った場合、pro-UKの41番目のCys残基より下流のpro-UKの翻訳領域および3'非翻訳領域をコードしていることが明らかになった。pUK1のcDNAがコードしているpro-UKのアミノ酸配列は、ホルムズら[Holmesら: バイオテクノロジー(Bio/Technology) 3, 923(1985)]の報告したものと一致していたが、以下に示す4つのアミノ酸のコドンの3番目の塩基が異なっていた。

254番目のアミノ酸Asn: AAC→AAT

340番目のアミノ酸Leu: CTA→CTG

345番目のアミノ酸Pro: CCC→CCA

346番目のアミノ酸Gln: CAA→CAG

この菌株は、Escherichia coli EUK1 FERM BP-1463)として、農工研に寄託されている。

参考例3.

65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用い、約530bpのDNA断片を精製した。一方、ノルランダーらが造成したプラスミドDNA pUC19 [Norlander, J. ら: ジーン(Gene) 25, 101(1983): pUC19プラスミドDNAは宝酒造社より入手できる] 約1μgを20mM KC₂を含むY-0緩衝液30μlに溶かし、16単位のSma Iを加え、30℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用い、約2.7KbのDNA断片を精製した。

このようにして得られたpRC19由来の約530bpのDNA断片(約0.01μg)とpUC19由来の約2.7KbのDNA断片(約0.05μg)とを20μlのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、200単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MN294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA、pCCK1を単離し、制限酵素による構造解析

ヒトpro-UKcDNAを運ぶプラスミドpUK11.の造成:

参考例2で得られたプラスミドpUK1がコードしているpro-UKcDNAはpro-UKのシグナル領域と成長因子ドメイン領域を含んでいないので、以下に示す手順を用いて、これらの領域を含むcDNAのクローン化を行った。

まず、cDNAのクローン化に用いるベクターpCCK2の造成を以下のようにして行った。

(1) 組換えプラスミドpCCK1の造成:

桑野らが造成した、ラット脳コレシストキニン(CCK、前駆体のcDNAを有するプラスミドpRC19 [桑野ら: ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.) 96, 923-926 (1984)]を持つ大腸菌HB101株を培養し、培養菌体から常法によりpRC19DNAを調製した。得られたpRC19DNA約3μgを30μlのY-50緩衝液に溶かし、1単位のPvu IIを加え、37℃で1時間消化反応を行った。この反応により、DNAはPvu IIにより部分的に消化された。

を行ったところ、目的の構造を有することを確認した(第15図参照)。

(2) 組換え体プラスミドpCCK2の造成:

上で得られたpCCK1プラスミドDNA約2μgを30μlのY-0緩衝液に溶かし、12単位のSac Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。さらに、1.5μlの2M NaClと10単位のBam H Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約0.55KbのDNA断片を精製した。一方、後述の参考例5で得られたpTrS33プラスミドDNA約2μgを上と同じ反応に供し、生じた約2.85KbのSac I-Bam H I断片をAFT法を用いて精製した。

このようにして得られたpCCK1由来の約0.55KbのDNA断片(約0.02μg)とpTrS33由来の約2.85KbのDNA断片(約0.1μg)とを20μlのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、50単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌 HB294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDHApCCX2を単離し、制限酵素による構造解析を行ったところ、目的の構造を有することを確認した(第16図参照)。

(C) ヒトpro-UKc DNAを運ぶプラスミドpUK11の単離:

参考例1で調製したDetroit 562細胞のポリ(A) RNA (mRNA) 約8 μ g (7 μ lの10mM Tris-HCl(pH7.5)-0.5mM EDTAに溶解されている)を65℃で10分間加熱した後、水中で急冷した。この溶液を、50mM Tris-HCl(pH8.3)、8mM MgCl₂、30mM KCl、5mM DTT、1mM dNTP (dATP、dTTP、dGTPおよびdCTP)、10単位のリボヌクレアーゼインヒビター(P-L Biochemicals社製)、および5 μ g/mlオリゴ(dT)₁₂₋₁₈ (コラボレーティブ社製) (全量80 μ l)となるように調整した後、41℃で15分間保温した。次いで、20単位の逆転写酵素(生化学

工業社製)を加え、41℃で90分間保温し、mRNAに相補的なcDNAを合成した。該反応物をフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈澱を行った後、40 μ lの0.3M NaOHに溶かし、37℃に15時間放置することによって、mRNAを加水分解した。次に、10 μ lの1M Tris-HCl(pH7.5)と40 μ lの0.3M HClを加えて中和した後、1本鎖cDNAをエタノール沈澱によって回収し、28.5 μ lのH₂Oに溶解した。

この溶液を、50mM Tris-HCl(pH8.3)、8mM MgCl₂、30mM KCl、5mM DTT、1mM dNTP (dATP、dTTP、dGTPおよびdCTP)、および2.5 μ g/ml合成 DNAプライマー CATGAGAGCCCTGCTGG (ヒトpro-UKのシグナル・ペプチド領域の一部の塩基配列と一致する) (全量40 μ l)となるように調整した後、65℃で10分間、続いて41℃で30分間保温した。次いで10単位の逆転写酵素を加え、41℃で60分間保温することにより、1本鎖cDNAを2本鎖cDNAに変換した。該反応物をフェノール

-クロロホルム抽出、エタノール沈澱を行った後、2.5mM NaClを含むY-0緩衝液30 μ lに溶かし、25単位のBsaH II (ニューイングランドバイオラブズ社製)を加え、50℃で2時間消化反応を行った。さらに、1.25 μ lの2M NaClと12単位のBsaH Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の加熱後、AFT法を用いて約1.1~1.4KbのcDNA断片を精製した。

一方、上で得られたpCCX2プラスミドDNA約2 μ gを上と同様にBsaH IIとBsaH Iで切断した後、AFT法を用いて約2.9KbのBsaH II-BsaH I断片を精製した。

このようにして得られた約1.1~1.4KbのcDNA断片(約0.02 μ g)とpCCX2由来の約2.9KbのDNA断片(約0.05 μ g)とを20 μ lのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、200単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換えプラスミド混合物を用いて、

大腸菌CB00SP8株を形質転換することにより、約25,000個のAp耐性株を取得し、これらのAp耐性株の中から、参考例2に述べたコロニー・ハイブリダイゼーション法を用いて、参考例2でpro-UKc DNAの単離に用いたプローブと同一のプローブと会合する陽性クローンを約1000個取得した。なお、ハイブリダイゼーションおよびフィルターの洗浄条件は参考例2と同様であった。このようにして得られた陽性クローン1株が持つプラスミドpUK11(第17図参照)を単離し、pro-UKのシグナル・ペプチド、成長因子ドメイン、クラングル・ドメイン領域の塩基配列をM13ファージを用いたディデオキシ・シーケンス法により決定した。その結果、その塩基配列は、ホルムズ(Holmesら: バイオテクノロジー(Bio/Technology) 3, 923(1985))の報告したものと一致していた。

例4

hG-CSP cDNAを運ぶプラスミドpCS P1-2およびpCSP2の造成

(1) 正常人末梢血マクロファージからのポリ (A) RNAの調製:

正常人の末梢血より遠心分離して得た白血球をプラスチックボトルで培養し、非接着性の細胞を洗浄・除去することにより、接着性の細胞であるマクロファージを単離した。このマクロファージより、チオシアン酸グアニジン-塩化リチウム法【カハラ (Cathala) ら: ディーエヌエイ (DNA) 2, 329 (1983)】に従い、ポリ (A) を有するRNAを下記のごとく調製した。

正常人の末梢血400mlをHitachi RPR10 ローターにて1800rpm、20分間遠心して白血球を沈殿させ、これを50mlリン酸緩衝食塩水 (NaCl 8g/l、KCl 0.2g/l、無水Na₂HPO₄ 1.15g/l、KH₂PO₄ 0.2g/l (pH7.2); 以下PBSと略記する) に懸濁した。この懸濁液25mlをリン酸緩衝液【ビオネティクス (BIONETICS) 社製】25mlに重懸し、Hitachi RPR10 ローターにて1800rpm、30分間遠心した。中間層の白血球を分

取し、等量のPBSで洗浄 (Hitachi RPR10 ローターにて1500rpm、10分間) した後、5%の仔牛胎児血清を含む20mlのRPMI 1640培地 (日本製薬社製) に、懸濁し培養した。培養には組織培養用フラスコ (コーニング社製) を用いた。37℃で1.5時間培養した後、培養上清を非接着性の細胞とともに除去した。新たに20mlの同培地と大腸菌リポ多糖 (LPS) を0.3mg/mlとなるように加え、さらに37℃で4時間培養した。次いで、培養液より1,100×g、4℃、10分間の遠心によって細胞を集め、80mlのPBSで洗浄した後、5Mチオシアン酸グアニジン、10mM EDTA、50mM Tris-HCl (pH7) および8% (v/v) 2-メルカプトエタノールからなる溶液10ml中でボルテックス・ミキサーを用い可溶化した。この可溶化物を遠心管に移し4M LiCl溶液80mlを加えて攪拌した後、4℃、20時間静置した。Hitachi RPR10 ローターにて9,000rpm、90分間遠心後、RNAを沈殿として回収した。R

NAの沈殿を4M尿素および2M塩化リチウムからなる溶液50mlに懸濁し、Hitachi RPR10 ローターにて9,000rpm、60分間遠心後、再びRNAを沈殿として回収した。

RNAの沈殿を0.1%ラウリル硫酸ナトリウム、1mM EDTA、10mM Tris-HCl (pH7.5) からなる溶液10mlに溶解し、フェノール-クロロホルムで抽出後、エタノール沈殿により回収した。得られたRNA約0.8mgを10mM Tris-HCl (pH8.0) および1mM EDTAからなる溶液1mlに溶かした。65℃、5分間インキュベートし、0.1mlの5M NaClを加えた。混合物をオリゴ (dT) セルロース・カラム【ビー・エル・バイオケミカル (P-L Biochemical) 社製】クロマトグラフィー (カラム体積0.5ml) にかけて。吸着したポリ (A) を有するmRNAを10mM Tris-HCl (pH7.5) および1mM EDTAからなる溶液で溶出し、ポリ (A) を有するmRNA約30μgを得た。

(2) cDNA合成と該cDNAのベクターへの挿入:

オカヤマーバーグ (Okayama-Berg) の方法【モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 2, 161 (1982)】に従い、cDNAの合成とそれを組み込んだ組換え体プラスミドの形成を行った。その工程の概略を第14図に示す。

上記で調製したポリ (A) RNA約3μg、ベクタープライマー約1.4μgを50mM Tris-HCl (pH8.3)、8mM MgCl₂、30mM KCl、0.3mM DTT、2mM dNTP (dATP、dTTP、dGTPおよびdCTP) および10単位のリボヌクレアーゼインヒビター (P-L Biochemicals社製) からなる溶液22.3μlに溶解し、10単位の逆転写酵素 (生化学工業社製) を加え、41℃で90分間インキュベートし、mRNAに相補的なDNAを合成させた。該反応物をフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、RNA-DNA二重鎖の付加したベクタープライマー

DNAを回収した。該DNAを88 μ M dCTPおよび0.2 μ Mポリ(A)を含むTdT緩衝液20 μ lに溶かし、14単位のTdT (P-L Biochemicals社製)を加えて37で2分間インキュベートし、cDNA3'末端に約20個の(dC)鎖を付加した。該反応物をフェノール-クロロホルム抽出し、エタノール沈殿により(dC)鎖の付加したcDNA-ベクタープライマーDNAを回収した。該DNAを10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 6 mM MgCl₂, および60 mM NaClからなる液400 μ lに溶かし、20単位のHind IIIを加え、37で2時間インキュベートし、Hind III部位で切断した。該反応物をフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿して0.5ピコモルの(dC)鎖付加cDNA-ベクタープライマーDNAを得た。該DNA0.2ピコモルおよび前記のリンカーDNA0.4ピコモルを10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 M NaClおよび1 mM EDTAからなる溶液100 μ lに溶か

し、65で、42で、0でそれぞれ10分、25分、30分間インキュベートした。20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4 mM MgCl₂, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1 M KClおよび0.1 mM β -NADの組成で、全量1000 μ lとなるよう反応液を調製した。該反応液に25単位の大腸菌DNAリガーゼ (ニューイングランド・バイオラブズ社製)を加え、11で18時間インキュベートした。該反応液を各40 μ MのdNTP, 0.15 mM β -NADとなるよう成分を追加調製し、10単位の大腸菌DNAリガーゼ、20単位の大腸菌DNAポリメラーゼ I (P-L Biochemicals社製) および10単位の大腸菌リボヌクレアーゼH (P-L Biochemicals社製)を加え、12で、25で順次1時間ずつインキュベートした。上記反応で、cDNAを含む組換えDNAの環状化と、RNA-DNA二重鎖のRNA部分がDNAに置換され、完全な二重鎖DNAの組換え体プラスミドが生成した。

図 1 hG-CSF cDNAを含む組換えDNAの選択:

図で得られた組換え体プラスミドを用い、大腸菌C800 SF 8株をスコット (Scott) らの方法 (重定編録: 細胞工学 2, 616 (1983)) に従い形質転換した。得られた約9200個のコロニーをニトロセルロース・フィルター上に固定した。長田ら [長田 (Nagata) ら: ネイチャー (Nature)

319, 415 (1986)] が単離したhG-CSFの成

熟タンパク質のN末端9アミノ酸に相当する27塩基の合成DNA

5'-ACCCCTCTG66CCCTG6CAGCTCCCTG-3'を³²Pで標識したプローブに60で強く会合した2

菌株を選んだ [グルンスタイン・ホグネス

(Grunstein-Hogness)の方法、プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA 72, 3961 (1975)]。これらの菌株がもつプラスミド

pCSF1-2およびpCSF2が有するcDNAの全塩基配列を、M13ファージを用いたデ

ィデオキシ・シーケンス法により決定した。

その結果、pCSF1-2およびpCSF2が有するcDNAは、hG-CSFをコードしていることが判明した。プラスミドpCSF1-2を含む微生物は *Escherichia coli* ECSF1-2 [FERM 8P-1220] として、またプラスミドpCSF2を含む微生物は *Escherichia coli* ECSF2 [FERM 8P-2073] として微生物に寄託してある。

参考例5

組換え体プラスミドpTrS33の造成:

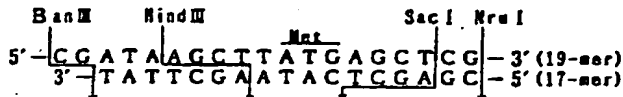
(1) ATGベクター-pTrS20の造成:

第18図に示した手順に従い、SD配列とATG開始コドンの間の距離が14塩基で、かつATGコドンの直後にSac Iサイトを有するATGベクター-pTrS20を造成した。

まず、特開昭58-110600号公報記載の方法で調製したpKYP10 3 μ gをY-100緩衝液30 μ lに溶かし、制限酵素Bam HIと制限酵素Nru I (ニューイングランド・バイオラ

ブズ社製)をそれぞれ6単位ずつ加え、37℃で3時間切断反応を行った。この反応液からLG T後によりP t r pを含む約3.8 KbのDNA断片(Ban III-Nru I断片)約0.5 μgを得た。

一方、P t r pの下流にATG開始コドンを含むために下記のDNAリンカーをトリエスナル法により合成した。

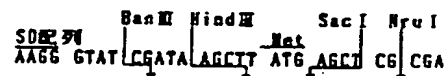


19-merと17-merの合成DNA(各々10ピコモルずつ)を50mM Tris-HCl(pH7.5)、10mM MgCl₂、5mMジチオスレイトール、0.1mM EDTAおよび1mM ATPを含む全量20 μlの溶液に溶かし、T4ポリヌクレオチドキナーゼ3単位(宝酒造社製)を加えて、37℃で60分間リン酸化反応を行った。

次に上記で得たpKYP10由来のBan III-Nru I断片(約3.8 Kb)0.1 μgと上記のDNAリンカー約0.5ピコモルをT4リガーゼ

緩衝液20 μlに溶かし、さらにT4 DNAリガーゼ2単位を加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて大腸菌HB101株[ガリバー(Boliver)ら:ジーン(Gene)2, 75(1977)]を感受性転換し、Amp^rのコロニーを得た。このコロニーの培養菌体からプラスミドDNAを回収した。得られたプラスミドの構造は制限酵素EcoRI、Ban III、Hind III、Sac I、Nru Iで切断後、アガロースゲル電気泳動により確認した。このプラスミドをpTrS20と名付けた(第18図)。pTrS20のBan III、Hind IIIサイト付近の塩基配列は下記のとおりであることをM13ファージを用いたディデオキシ・シーケンス法を用い確認した。

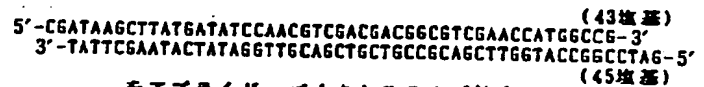


② pTrS33の作成:

上で得られたpTrS20プラスミドDNA

約3 μgを30 μlのY-0緩衝液に溶かし、12単位のSac Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。さらに1.5 μlの2M NaClと10単位のPst Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。85℃、10分間の熱処理後、AFT法により約1.15 KbのDNA断片を精製した。一方、特開昭62-48699号公報記載の方法で調製したpKYP26[pKYP26を含む大腸菌はEscherichia coli 1 KYP26 (FERM 8P-883)として微生物研究所に寄託されている]2 μgを30 μlのY-100緩衝液に溶かし、8単位のPst Iと10単位のBam HIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。85℃、10分間の熱処理後、AFT法により約1.7 KbのDNA断片を精製した。また、M13mp18RF DNA (Norraander, J.ら:ジーン(Gene)26, 101(1983):M13mp18RF DNAは宝酒造社より入手した)2 μgを30 μlのY-0緩衝液に溶かし、10単位のSac Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。さらに1.5 μlの1M NaClと10単位のClai

を加え、37℃で2時間消化反応を行った。85℃、10分間の熱処理後、AFT法により約0.65 KbのDNA断片を精製した。これらとは別に、第19図に示す2種の合成DNA(43塩基と45塩基)



をアプライド・バイオシステムズ社380A DNA合成機を用いて合成し、それぞれ別々に上に述べた方法と同じ方法を用いて5'-リン酸化した。

このようにして得られたpTrS20由来の約1.15 KbのDNA断片(約0.1 μg)、pKYP26由来の約1.7 KbのDNA断片(約0.1 μg)、M13mp18由来の約0.85 KbのDNA断片(約0.05 μg)、および5'-リン酸化された上記2種の合成DNA(それぞれ1 pmoleずつ)を20 μlのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、50単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

このようにして得られた組換え体プラスミド

の混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドpTrS33を単離し、制限酵素消化による構造解析およびM13ファージを用いたディデオキシ・シーケンス法により、pTrS33が目的の構造を有することを確認した(第19図参照)。

参考例6.

組換えプラスミドpTerm2の造成:

pKYP26プラスミドDNA[特開昭62-48699号公報]約2 μ gを10mM Tris-HCl (pH8.0)、75mM NaCl、7mM MgCl₂、8mM 2-メルカプトエタノールを含む溶液30 μ lに溶かし、18単位のAap718(ペーリンガー・マンハイム社製)と10単位のPst Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約1.7KbのDNA断片を精製した。一方、参考例5の(1)で得られたpTrS20プラスミドDNA約2 μ gを30 μ lのY-100緩衝液に溶かし、8単位のPst Iと10単位のNru I(ペーリンガー・

ことを確認した(第20図参照)。

参考例7.

組換え体プラスミドpTSF10の造成:

参考例1で得られたヒトt-PA cDNAを運ぶプラスミドp tPA7を持つ大腸菌C800SP8株の培養液から常法によりp tPA7 DNAを調製した。得られたp tPA7 DNA約2 μ gをY-100緩衝液30 μ lに溶かし、制限酵素Bam HI 8単位を加え37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用い、約2.0KbのDNA断片を精製した。次にpTrS33DNA(参考例5)約2 μ gを30 μ lのY-100緩衝液中で10単位の制限酵素Bam HIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用い、約2.8KbのDNA断片を精製した。

このようにして得られたp tPA7由来の約2.0KbのDNA断片(約0.1 μ g)とpTrS33由来の約2.8KbのDNA断片(約0.1 μ g)を、全量20 μ lのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、T4 DNAリ

マンハイム社製)を加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約1.5KbのDNA断片を精製した。また、第28図に示す2種の合成DNA(19塩基と23塩基)をアプライド・バイオシステムズ社380A-DNA合成機を用いて合成し、それぞれを別々に上で述べた方法と同様の方法を用いて5'-リン酸化した。

このようにして得られたpKYP26由来の約1.7KbのDNA断片(約0.1 μ g)、pTrS20由来の約1.15KbのDNA断片および5'-リン酸化された2種の合成DNA(それぞれ1 μ molずつ)を20 μ lのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、50単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA、pTerm2を単離し、制限酵素消化による構造解析およびM13ファージを用いたディデオキシ・シーケンス法により、pTerm2が目的の構造を有する

ガーゼ50単位を加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA pTSF10を単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、目的の構造を有することを確認した(第21図参照)。

参考例8.

組換え体プラスミドpTA4の造成:

実施例7より得られたpTSF10プラスミドDNA約3 μ gをY-0緩衝液30 μ lに溶かし、12単位の制限酵素Kpn Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った後、1.5 μ lの3M NaClと12単位の制限酵素Bst E II(ニューイングランドバイオラプス(New England Biolabs)社製)を加え、さらに80℃で2時間消化反応を行った。続いてAFT法を用い、約0.3KbのDNA断片を精製した。

これとは別に、大腸菌IGHA2(微工研 FBRN

BP-400)を培養し、培養菌体から常法によりpGHA 2プラスミドDNA(特開昭60-221091)を調製した。得られたpGHA 2 DNA約2 μ gを30 μ lのY-100緩衝液に溶かし、8単位のPst Iと8単位のBgl IIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。85℃、10分間の熱処理後、AFT法を用い、約0.75 KbのDNA断片を精製した。

また、pTPA7 DNA(参考例1)約3 μ gを3.0 μ lのY-150緩衝液に溶かし、10単位のBgl IIを加え、37℃で2時間消化反応を行った後、12単位のBst IIを加え、さらに60℃で2時間消化反応を行った。続いてAFT法を用い、約1.55 KbのDNA断片を精製した。

また、参考例8で得られたpTerm2 DNA約2 μ gを30 μ lのY-0緩衝液中で12単位のKpn Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った後、1.5 μ lの2M NaClと8単位のPst Iを加え、さらに37℃で2時間消化反応を行った。続いてAFT法を用い、約1.7 KbのDNA断片を

精製した。

このようにして得られた4種類のDNA断片(pTSP10由来の断片0.03 μ g、pGHA 2由来の断片0.05 μ g、pTPA7由来の断片0.1 μ g、およびpTerm2由来の断片0.1 μ g)を20 μ lのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、200単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA pTA4を単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、目的の構造を有することを確認した(第22図参照)。

参考例9.

t-PA発現プラスミドpS81PA1581dbfr1-9Aの造成:

(1) 組換え体プラスミドpAGE105Mの造成:

本発明者らによって造成されたプラスミドpAGE28(水上ら:ジャーナル・オブ・バイ

オケミストリー(J. Biochem.) 101, 1307-1310(1987))を持つ大腸菌HB101株を培養し、培養菌体から常法によりpAGE28 DNAを調製した。得られたpAGE28 DNA約2 μ gを30 μ lのY-100緩衝液に溶かし、8単位のXho Iと12単位のSca Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。85℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約2.8 KbのDNA断片を精製した。一方、本発明者らによって造成されたプラスミドpAGE103(水上ら:ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.) 101, 1307-1310(1987))を持つ大腸菌HB101株を培養し、培養菌体から常法によりpAGE103 DNAを調製した。得られたpAGE103 DNA約3 μ gを30 μ lのY-100緩衝液に溶かし、10単位のEco RIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。フェノール抽出とクロロホルム抽出の後、エタノール沈澱によってDNA断片を回収した。このDNA断片を全量40 μ lのポリメラーゼ緩衝液に溶かし、8単位のクレーン断片を加

え、15℃で1時間反応させることにより、Eco RI突出末端を平頭末端に変えた。反応をフェノール抽出によって止め、クロロホルム抽出を行った後、エタノール沈澱によってDNA断片を回収した。このDNA断片を30 μ lのY-100緩衝液に溶かし、12単位のXho Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。85℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約0.4 KbのDNA断片を精製した。また、O'Haraらによって造成されたプラスミドpKCR(O'Haraら:プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) USA 78, 1527(1981))を持つ大腸菌HB101株を培養し、培養菌体から常法によりpKCR-DNAを調製した。得られたpKCR-DNA約2 μ gを30 μ lのY-150緩衝液に溶かし、12単位のBam HIと16単位のSma Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。フェノール抽出とクロロホルム抽出の後、エタノール沈澱によってDNA断片を回収した。

このDNA断片を全量40 μ lのポリメラーゼ緩衝液に溶かし、8 位のクレノー断片を加え、15℃で1時間反応させることにより、BamHI突出末端とSmaI突出末端を平坦末端に変えた。65℃、10分間の熱処理の後、AFT法を用いて約1.85KbのDNA断片を精製した。

このようにして得られたpAGE28由来の約2.8KbのDNA断片(約0.05 μ g)、pAGB103由来の約0.4KbのDNA断片(約0.03 μ g)、およびpKCR由来の約1.85KbのDNA断片(約0.2 μ g)を20 μ lのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、300単位のT4DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

このようにして得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、カナマイシン(以下、Kmと略記する)耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドpAGE105Mを単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、目的の構造を有することを確認した(第23図参照)。

(3) t-PA発現プラスミドpSE1PA1-5の造成:

上で得られたpAGE106DNA約2 μ gを30 μ lのY-0緩衝液に溶かし、12単位のKpnIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。さらに、1.5 μ lの2M NaClと10単位のBamHIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約5.0KbのDNA断片を精製した。一方、参考例1で得られたptPA7プラスミドDNA約3 μ gを75mM NaClを含むY-0緩衝液30 μ lに溶かし、12単位のFokIと、12単位のEcoRIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約0.7KbのDNA断片を精製した。また、第25図に示す2種の合成DNA(21塩基と21塩基)

5'-GATCCATGGATGCAATGAAGA-3' (21塩基)
3'-GTACCTACGTTACTTCTCTCC-5' (21塩基)

をアプライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成機を用いて合成し、それぞれ別々に実施例1で述べた方法と同様の方法を用いて5'-リン酸化した。

(2) 組換え体プラスミドpAGE106の造成:

上で得られたpAGE105M・DNA約2 μ gを30 μ lのY-100緩衝液に溶かし、12単位のScaIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約5.0KbのDNA断片を精製した。一方、実施例1と同様の方法で、5'-リン酸化されたEcoRIリンカーを調製した。

このようにして得られたpAGE105M由来の約5.0KbのDNA断片(約0.1 μ g)と1ピコモルの5'-リン酸化されたEcoRIリンカーを20 μ lのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、100単位のT4DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Km耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA pAGE106を単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、pAGE106は目的の構造を有することを確認した(第24図参照)。

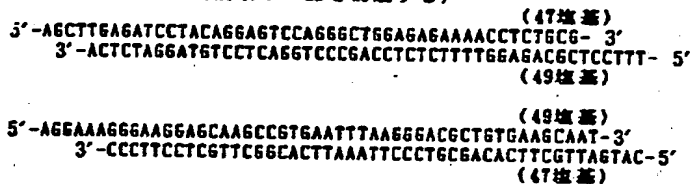
このようにして得られたpAGE106由来の約5.0KbのDNA断片(約0.1 μ g)とptPA7由来の約0.7KbのDNA断片(約0.1 μ g)、参考例8で調製されたpTA4由来の約1.4KbのEcoRI-KpnI断片(約0.05 μ g)、および上で得られた5'-リン酸化された2種の合成DNA(それぞれ1 μ molずつ)を20 μ lのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、50単位のT4DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Km耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA pSE1PA1-5を単離し、制限酵素消化による構造解析およびM13ファージを用いたディデオキシ・シーケンス法により、pSE1PA1-5が目的の構造を有することを確認した(第25図参照)。

(4) t-PA発現プラスミドpSE1PA1-9の造成:

上で得られたpSE1PA1-5DNA約2

μgを30μlのY-0緩衝液に溶かし、12単位のKpn Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。さらに、1.5μlの2M NaClと8単位のHind IIIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約5.0 KbのDNA断片を精製した。一方、pSE1PA1-5 DNA約2μgを30μlのY-0緩衝液に溶かし、12単位のKpn Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。さらに、1.0μlの2M NaClと10単位のNco Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約4.9 KbのDNA断片を精製した。また第28図に示す4種の合成DNA (47塩基、49塩基、49塩基および47塩基：これらの合成DNAはpPAcDNAの5'非翻訳領域の一部を構成する)



④ 組換えプラスミドpUC19Hの造成 (Ap耐性遺伝子のポータブル化) :

ノルランダーらが造成したプラスミドDNA pUC19 [Norlander, J. ら: ジーン (Gene) 25, 101 (1983) : pUC19 プラスミドDNA は宝酒造社より入手できる] を持つ大腸菌HB101株を培養し、培養菌体から常法によりpUC19DNAを調製した。得られたpUC19DNA約2μgを30μlのY-50緩衝液に溶かし、10単位のHind IIIと1単位のDra Iを加え、37℃で1時間消化反応を行った。この反応により、DNAはHind IIIで完全に、Dra Iで部分的に消化された。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用い、約1.55 KbのHind III-Dra I断片と約1.1 KbのDra I-Hind III断片の2種のDNA断片を精製した。別に、20ピコモル(picoles)のHind IIIリンカー (CAAGCTTG: コラボレイティブ・リサーチ社製) を実施例1で述べた方法と同様の方法を用いて5'-リン酸化した。

このようにして得られたpUC19由来の約

をアプライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成機を用いて合成し、それぞれ別々に実施例1で述べた方法と同様の方法を用いて5'-リン酸化した。

このようにして得られたpSE1PA1-5由来の約5.0 KbのDNA断片 (約0.1 μg) とpSE1PA1-5由来の約4.9 KbのDNA断片 (約0.1 μg) と5'-リン酸化された4種の合成DNA (それぞれ1 picoles ずつ) を20μlのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、50単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Km耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA pSE1PA1-9を単離し、制限酵素消化による構造解析およびM13ファージを用いたディデオキシ・シーケンス法により、pSE1PA1-9が目的の構造を有することを確認した (第28図参照)。

1.55 KbのDNA断片 (0.03 μg) と約1.1 KbのDNA断片 (0.03 μg) および1ピコモルの5'-リン酸化されたHind IIIリンカーを20μlのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、50単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA pUC19Hを単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、目的の構造を有することを確認した (第27図参照)。

④ 組換え体プラスミドpSE1PA1-9Aの造成

(pSE1PA1-9へのAp耐性遺伝子の挿入) :

上で得られたpUC19HプラスミドDNA約2μgを30μlのY-50緩衝液に溶かし、8単位のHind IIIと8単位のPru IIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。フェノール抽出とクロロホルム抽出の後、エタノール沈殿によってDNA断片を回収した。このDNA断片を

全量40 μ lのポリメラーゼ緩衝液に溶かし、8単位のクレノー断片を加え、15 $^{\circ}$ Cで1時間反応させることにより、Hind III突出末端を平坦末端に変えた。65 $^{\circ}$ C、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約1.4 KbのDNA断片を精製した。一方、上で得られたpPA1-9AプラスミドpSEIPA1-9A約2 μ gを30 μ lのY-150緩衝液に溶かし、8単位のXho Iと8単位のEcoRVを加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間消化反応を行った。65 $^{\circ}$ C、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約5.9 KbのDNA断片を精製した。また、上で精製したpAGE28プラスミドDNA約3 μ gを30 μ lのY-150緩衝液に溶かし、10単位のXho Iと10単位のEcoRVを加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間消化反応を行った。65 $^{\circ}$ C、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約0.85 KbのDNA断片を精製した。

このようにして得られたpUC19H由来の約1.4 KbのDNA断片(約0.1 μ g)とpSEIPA1-9A由来の約5.9 KbのDNA断片(約0.1 μ g)と

を行った。フェノール抽出とクロロホルム抽出の後、エタノール沈殿によってDNA断片を回収した。このDNA断片を全量40 μ lのポリメラーゼ緩衝液に溶かし、8単位のクレノー断片を加え、15 $^{\circ}$ Cで1時間反応させることにより、Amp^r718突出末端を平坦末端に変えた。続いてフェノール抽出とクロロホルム抽出の後、エタノール沈殿によって回収したDNA断片を全量30 μ lのY-150緩衝液に溶かし、10単位のMlu Iを加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間消化反応を行った。65 $^{\circ}$ C、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約3.3 KbのDNA断片を精製した。

これとは別に、dhfr遺伝子を運ぶpSV2dhfrプラスミドDNA【スブラマニ(Subramani)ら: モレキュラー・セルラー・バイオロジー (Vol. Cell Biol.) 1, 854 (1981)】約3 μ gを30 μ lのY-100緩衝液に溶かし、12単位のBgl IIを加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間消化反応を行った。フェノール抽出とクロロホルム

pAGE28由来の約0.85 KbのDNA断片(約0.05 μ g)を20 μ lのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、100単位のT4 DNAリガーゼを加え、4 $^{\circ}$ Cで18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、AmpとKmの両方に耐性になった株を得た。この形質転換後からプラスミドDNA pSEIPA1-9Aを単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、目的の構造を有することを確認した(第28図参照)。

プラスミドDNA pSEIPA1-9Aを含む微生物はEscherichia coli BpPA1-9A PERM BP-1460として昭和62年9月3日付で微工研に寄託してある。

(7) 組換え体プラスミドpSE1dhfr1Aの作成:

上で得られたpAGE106プラスミドDNA約2 μ gを30 μ lのY-50緩衝液に溶かし、12単位のAmp^r718(ペーリンガー・マンハイム社製)を加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間消化反応

ム抽出の後、エタノール沈殿によってDNA断片を回収した。このDNA断片を全量40 μ lのポリメラーゼ緩衝液に溶かし、8単位のクレノー断片を加え、15 $^{\circ}$ Cで1時間反応させることにより、Bgl II突出末端を平坦末端に変えた。続いて、フェノール抽出とクロロホルム抽出の後、エタノール沈殿によって回収したDNA断片を全量30 μ lのY-100緩衝液に溶かし、12単位のHind IIIを加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間消化反応を行った。65 $^{\circ}$ C、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約0.75 KbのDNA断片を精製した。また、上で得られたpSEIPA1-9AプラスミドDNA約3 μ gを30 μ lのY-100緩衝液に溶かし、12単位のHind IIIを加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間消化反応を行った。さらに、1.5 μ lの1M NaClと12単位のMlu Iを加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間消化反応を行った。65 $^{\circ}$ C、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約2.9 KbのDNA断片を精製した。

このようにして得られたpAGE108由来の

DNA断片(約0.1 μ g)とpSV2dhfr由来のDNA断片(約0.03 μ g)とpSE1PA1-9A由来のDNA断片(約0.1 μ g)を20 μ lのT4DNAリガーゼ緩衝液に溶かし、100単位のT4DNAリガーゼを加え、4 $^{\circ}$ Cで18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA pSE1dhfr1Aを単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、目的の構造を有することを確認した(第29図参照)。

(例) 組換え体プラスミド pSE1PA1SE1dhfr1-9Aの造成:

上で得られたpSE1dhfr1AプラスミドDNA約3 μ gを30 μ lのY-100緩衝液に溶かし、12単位のXhoIを加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間消化反応を行った。フェノール抽出とクロロホルム抽出の後、エタノール沈殿によってDNA断片を回収した。このDNA断片を全量

出とクロロホルム抽出の後、エタノール沈殿によって回収したDNA断片を全量30 μ lのY-150緩衝液に溶かし、12単位のMluIを加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間消化反応を行った。65 $^{\circ}$ Cで、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約6.75KbのDNA断片を精製した。

このようにして得られたpSE1dhfr1A由来のDNA断片(約0.1 μ g)とpSE1PA1-9A由来のDNA断片(約0.1 μ g)を20 μ lのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、100単位のT4DNAリガーゼを加え、4 $^{\circ}$ Cで18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA pSE1PA1SE1dhfr1-9Aを単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、目的の構造を有することを確認した(第29図参照)。

40 μ lのポリメラーゼ緩衝液に溶かし、6単位のクレノー断片を加え、15 $^{\circ}$ Cで1時間反応させることにより、XhoI突出末端を平坦末端に変えた。続いて、フェノール抽出とクロロホルム抽出の後、エタノール沈殿によって回収したDNA断片を全量30 μ lのY-150緩衝液に溶かし、12単位のMluIを加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間消化反応を行った。65 $^{\circ}$ Cで、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約4.4KbのDNA断片を精製した。

これとは別に、上で得られたpSE1PA1-9AプラスミドDNA約3 μ gを30 μ lのY-50緩衝液に溶かし、12単位のClaIを加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間消化反応を行った。フェノール抽出とクロロホルム抽出の後、エタノール沈殿によってDNA断片を回収した。このDNA断片を全量40 μ lのポリメラーゼ緩衝液に溶かし、6単位のクレノー断片を加え、15 $^{\circ}$ Cで1時間反応させることにより、ClaI突出末端を平坦末端に変えた。続いて、フェノール抽

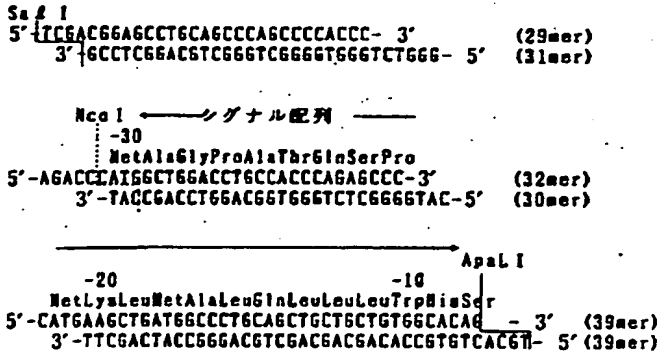
参考例10.

hG-CSF発現プラスミド pAS3-3の造成: (第30および31図参照)。

(1) 組換え体プラスミド pCSF3-3の造成:

参考例4で得たpCSF2、2 μ gを20 μ lのY-150緩衝液に溶かし、制限酵素SmaIを10単位加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間消化反応を行った。その後、制限酵素ApaLIを5単位加え、37 $^{\circ}$ Cでさらに10分間部分切断反応を行った。この反応液からLGT法により、約4.0KbのDNA断片(SmaI-ApaLI断片)約1.5 μ gを得た。

一方、hG-CSFの翻訳領域を完全に含むcDNAを得るために、下記に示した3つのDNAリンカーを合成した。



上に示した29mer、31mer、32mer、30mer および39mer (2種) の一本鎖DNAは、アプライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成機を用いて合成した。互いに相補的な29merと31merは各々20ピコモルずつを40μlのT4キナーゼ緩衝液に溶かし、T4ポリヌクレオチドキナーゼ8単位を加えて、37℃で60分間リン酸化反応を行った。互いに相補的な32merと30merおよび39mer同志についても同様にしてリン酸化反応を行った。

反応液からLGT法により約0.7KbのDNA断片(Dra I-Sa I断片)約0.6μgを得た。

これとは別に、参考例9で得たPAGE106、2μgを30μlのY-0緩衝液に溶かし制限酵素Sma I 10単位を加え、37℃で2時間切断反応を行った。その後、NaCl濃度が150mMになるようにNaClを添加し、制限酵素Sa Iを10単位加えて、37℃でさらに2時間切断反応を行った。この反応液からLGT法により約5.0KbのDNA断片(Sma I-Sa I断片)約1.5μgを得た。

次に上記で得た、pCSF3-3由来のDra I-Sa I断片(約0.7Kb)約0.6μgとPAGE106由来のSma I-Sa I断片(約5.0Kb)約1.0μgをT4DNAリガーゼ緩衝液25μlに溶かし、400単位のT4DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

該反応液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、Ap耐性株を取得した。該形質転換株よりプラスミドを単離し、制限酵素切断による

上記で得られたpCSF2由来のSa I-Apa I断片(約4.0Kb)0.1μgをT4DNAリガーゼ緩衝液30μlに溶かし、上記3種のDNAリンカーを2ピコモルずつ加えた。さらにT4DNAリガーゼ400単位を加え、4℃で18時間結合反応を行った。

該反応液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、Ap耐性株を取得した。該形質転換株よりプラスミドDNAを単離し、制限酵素切断による構造解析を行った結果、目的とするプラスミドDNA、pCSF3-3であることを確認した。

(2) hG-CSF発現プラスミドpSE1GC3-3の造成:

前項で得たpCSF3-3、3μgを40μlのY-0緩衝液に溶かし制限酵素Dra I 10単位を加えて、37℃で2時間消化反応を行った。NaCl濃度が150mMになるようにNaClを添加し、制限酵素Sa Iを10単位加えて、37℃でさらに2時間切断反応を行った。この

構造解析を行った結果、目的とするプラスミドDNA、pSE1GC3-3であることを確認した。

(3) hG-CSF発現プラスミドPAS3-3の造成:

pCfTA1(参考例15参照)5μgを50μlのY-100緩衝液に溶かし、制限酵素Hind IIIおよびBam HIを各々10単位加え、37℃で2時間消化反応を行った。この反応液からLGT法により約1.6KbのDNA断片(Hind III-Bam HI断片)1μgを得た。この約1.6KbのDNA断片1μgを50μlのY-100緩衝液に溶かし、制限酵素Dde I(東洋紡績社製)を10単位加え37℃で2時間消化反応を行った。フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿でDNAを回収し、30μlのクレン緩衝液に溶かし、DNAポリメラーゼI・クレン断片を2単位加えて37℃で1時間反応を行った。68℃で10分間処理しDNAポリメラーゼI・クレン断片を失

活させた後、エタノール沈殿でDNAを回収した。回収したDNAは20 μ lのK-50緩衝液に溶かし制限酵素Aat II (東洋紡績社製)

10 単位を加えて37℃で2時間切断反応を行った。この反応液よりLGT法により約0.2 KbのDNA断片(Dde I (平坦末端)-Aat II断片)約0.1 μ gを得た。

別に前項で得たpSEIGC3-3の2 μ gを20 μ lのK-50緩衝液に溶かし、制限酵素Aat II (東洋紡績社製) 10 単位を加え、37℃で2時間消化反応を行った。その後、制限酵素Xho Iを10 単位加え、37℃でさらに2時間消化反応を行った。この反応液よりLGT法により約0.8 KbのDNA断片(Aat II-Xho I断片)約0.1 μ gを得た。

一方、参考例9で得たpSB1PA1SB1dhfr1-9Aの2 μ gを20 μ lのY-0緩衝液に溶かし、制限酵素Sma Iを10 単位加え、37℃で2時間消化反応を行った。その後、NaCl濃度が100 mMになるようにNaClを添加し、制限酵素

Xho Iを10 単位加え、37℃でさらに2時間消化反応を行った。この反応液からLGT法により約8.7 KbのDNA断片(Sma I-Xho I断片)約1 μ gを得た。

上記のようにして得たpC1TA1由来のDde I (平坦末端)、Aat II断片(約0.2 Kb)約0.1 μ g、pSEIGC3-3由来のAat II-Xho I断片(約0.8 Kb)約0.1 μ g、pSE1PA1SE1dhfr1-9A由来のSma I-Xho I断片(約8.7 Kb)約1 μ gを30 μ lのT4 DNAリガーゼ緩衝液に溶かし400 単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、Ap耐性株を得た。該形質転換株よりプラスミドを単離し、制限酵素切断による構造解析を行った結果、目的の構造を有するプラスミドDNA、pAS3-3であることを確認した。

参考例11.

組換え体プラスミドpUKA2の造成:

参考例2で得られたヒトpro-UKcDNAを運ぶプラスミドpUK1を持つ大腸菌C600SF8株から常法によりpUK1DNAを調製した。得られたpUK1DNA約2 μ gをY-100緩衝液30 μ lに溶かし、8単位の制限酵素Hco Iと8単位のStu Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約1.2 KbのDNA断片を精製した。一方、参考例5で得られたpTrS33プラスミドDNA約2 μ gを10mM Tris-HCl(pH 7.5)、25mM KCl、7mM MgCl₂、5mM 2-メルカプトエタノールを含む溶液(以下、“K-25緩衝液”と略称する)30 μ lに溶かし、16単位の制限酵素Sma Iを加え、30℃で2時間消化反応を行った。続いて1.5 μ lの1M NaClと10単位のHco Iを加え、さらに37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約2.85 KbのDNA断片を精製した。

このようにして得られたpUK1由来の約1.2 KbのDNA断片(約0.05 μ g)とpTrS33由来の約2.85 KbのDNA断片(約0.1 μ g)を、全量20 μ l

のT4リガーゼ緩衝液に溶かし、T4 DNAリガーゼ100 単位を加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA、pUKA2を単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、目的の構造を有することを確認した(第32図参照)。

参考例12.

組換え体プラスミドpUKB101の造成:

上で得られたpUKA2プラスミドDNA約2 μ gをY-0緩衝液30 μ lに溶かし、12単位の制限酵素Kpa Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。続いて1.5 μ lの2M NaClと10単位のHco Iを加え、さらに37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約1.2 KbのDNA断片を精製した。一方、参考例5で得られたpTrS33プラスミドDNA約2 μ gを30 μ lのK-25緩衝液に溶かし、16単位のSma Iを加え、30℃で2

時間消化反応を行った。続いて1.5 μ lの2M NaClと10単位のPst Iを加え、さらに37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約1.15 KbのDNA断片を精製した。また、参考例8で得られたpTerm2プラスミドDNA約2 μ gを30 μ lのY-0緩衝液に溶かし、12単位のKpn Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。続いて1.5 μ lの2M NaClと10単位のPst Iを加え、さらに37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約1.7KbのDNA断片を精製した。また、下記2種の合成DNA (41merと45mer)をアプライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成機を用いて合成した。

5'-GGGAATGGTCACTTTTACCGAGGAAAGGCCAGCACTGACAC-3' (41mer)
 /-CCCTTACCAGTGAAGATGGCTCCTTCCGCTCGTACTGTGTTAC-5' (45mer)

これらの合成DNAを20ピコモル(pmoles)ずつ別々に、20 μ lのT4キナーゼ緩衝液中で5単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼを加え、37℃で30分間反応させることにより、合成DNAの5'末端をリン酸化した。

のNco Iと12単位のHind IIIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約0.45KbのDNA断片を精製した。一方、実施例11の(1)で得られたpUKA-2プラスミドDNA約2 μ gを30 μ lのY-0緩衝液に溶かし、10単位のKpn Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。続いて1.5 μ lの2M NaClと10単位のNco Iを加え、さらに37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約1.2 KbのDNA断片を精製した。また、参考例6で得られたpTerm2プラスミドDNA約2 μ gを30 μ lのY-0緩衝液に溶かし、10単位のKpn Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。続いて1.5 μ lの2M NaClと8単位のHind IIIを加え、さらに37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約2.85KbのDNA断片を精製した。

このようにして得られたpUK11由来の0.45 KbのDNA断片(約0.02 μ g)、pUKA2由来の約1.2 KbのDNA断片(約0.05 μ g)、および

このようにして得られたpUKA2由来の約1.2 KbのDNA断片(約0.05 μ g)、pTrS33由来の約1.15 KbのDNA断片(約0.05 μ g)、pTerm2由来の約1.7 KbのDNA断片(約0.05 μ g)、および5'リン酸化された2種の合成DNA (1ピコモルずつ)を全量20 μ lのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、300単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MN294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA、pUKB101を単離し、制限酵素消化による構造解析およびM13ディデオキシ・シーケンス法による塩基配列決定を行ったところ、pUKB101は目的の構造を有することを確認した(第33図参照)。

参考例13.

ヒトpro-UK発現プラスミドpSE1UKpro1-1Aの造成:

(1) 組換えプラスミドpUKP2の造成:

参考例3で得られたpUK11プラスミドDNA約3 μ gを30 μ lのY-100緩衝液に溶かし、12単位

pTerm2由来の2.85KbのDNA断片(約0.05 μ g)を全量20 μ lのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、50単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MN294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA、pUKP2を単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、pUKP2は目的の構造を有することを確認した(第34図参照)。

(2) 組換えプラスミドpUKPproの造成:

上で得られたpUKP2プラスミドDNA約2 μ gを30 μ lの25mM NaClを含むY-0緩衝液に溶かし、10単位のBamHI (ニューイングランド・バイオラブズ社製)を加え、50℃で2時間消化反応を行った。続いて1.0 μ lの2M NaClと10単位のHind IIIを加え、さらに37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約4.3 KbのDNA断片を精製した。一方、下記8種の合成DNA (39mer、41mer、41mer、

39mer, 17mer, 17mer)を上で述べた方法に従い、

合成および5'-末端のリン酸化を行った。

5'-AGCTTGTCCCCGACGCGCCCTCGCCCTCTGCGCCAG- 3' (39mer)

3'-ACAGGGGCTCGCGGACGCGGCGAGGACGCGCTCCGGTGG- 5' (41mer)

5'-GCCACCGAGGCGCGCGCTCTAGCGCCCCGACCTCGCCAC- 3' (41mer)

3'-CTCCGCGCGGCGAGATCGCGGGCTGAGGCGGTGGTAC- 5' (39mer)

5'-CATG AGA GCC CTG CTG G-3' (17mer)

3'-TCT CGG GAC GAC C GCGC-5' (17mer)

このようにして得られたpUKF.2由来の約

4.3 KbのDNA断片(約0.1 μg)と5'-リン酸化された6種の合成DNA(1ピコモルずつ)を全量20 μlのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、300単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MN294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA、pUKF proを単離し、制限酵素消化による構造解析およびM13ディデオキシ・シーケンス法による塩基配列決定を行ったところ、pUKF proは目的の構

造を有することを確認した(第35図 照)。

(C) 組換え体プラスミドpSE1UKpro1-1Aの造成:

考例9で得られたpSE1PA1-9Aプラスミド

DNA約2 μgを30 μlのY-0緩衝液に溶かし、10単位のKpn Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。続いて1.5 μlの2M NaClと10単位のHind IIIを加え、さらに37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約6.3 KbのDNA断片を精製した。一方、上で得られたpUKF proプラスミドDNA約3 μgを30 μlのY-0緩衝液に溶かし、15単位のKpn Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。続いて1.5 μlの2M NaClと10単位のHind IIIを加え、さらに37℃で2時間消化反応を行った。

65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約1.55 KbのDNA断片を精製した。

このようにして得られたpSE1PA1-9A由来の約6.3 KbのDNA断片(約0.1 μg)とpUKF pro由来の1.55 KbのDNA断片(約0.05 μg)を全量20 μlのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、100単位の

T4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MN294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA pSE1UKpro1-1Aを単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、pSE1UKpro1-1Aは目的の構造を有することを確認した(第36図参照)。

参考例14.

1) ヒトLTc DNAを運ぶプラスミドpLT.Iの単離:

(1) Luk II細胞よりのポリ(A) RNAの調製:

ヒトリンパ芽球細胞株Luk IIより、チオシアン酸グアニジン塩化リチウム法(Cathalaら: ディーエヌエイ(DNA) 2, 329 (1983))に従い、ポリ(A)を有するRNAを下記のごとく調製した。

ヒトリンパ芽球細胞株Luk II [ベリッシュ・ウィー・ルビン(Berish Y. Rubin)ら: プロ

シーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82, 5637 (1985))を、5%の仔牛胎児血清と1 mM N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸(HEPES)を含む1 lのRPMI 1640培地(日本製薬社製)に、 8×10^5 cells/mlとなるように接種し、増殖させた。培養にはスピナー・カルチャー・ボトルを用いた。37℃で48時間培養した後、遠心によって細胞を集め、100g/mlのフォルボール・ミリスチート・アセテート(PMA: Phorbol myristate acetate)と5%の仔牛胎児血清と1 mM HEPESを含む、新しい1 lのRPMI 1640培地に移し、さらに37℃で48時間培養した。続いて、この細胞懸濁液の一部(250 μl)から1.100 × g, 4℃、10分間の遠心によって細胞を集め、80 μlのリン酸塩バッファーで洗浄した後、5 Mチオシアン酸グアニジン, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 7) および

8% (V/V) 2-メロカプトエタノールからなる溶液10ml中でボルテックス・ミキサーを用いて可溶化した。この可溶化物を遠心管に移し、4M LiCl溶液80mlを加えて攪拌した後、4℃、20時間静置した。Hitachi RPR10ローターにて9,000rpm、90分間遠心後、RNAを沈殿として回収した。RNAの沈殿を4M尿素および2M塩化リチウムからなる溶液50mlに懸濁し、Hitachi RPR10ローターにて9,000rpm、60分間遠心後、再びRNAを沈殿として回収した。RNAの沈殿を0.1%ラウリル硫酸ナトリウム、1mM EDTA、10mM Tris-HCl (pH 7.5) からなる溶液10mlに溶解し、フェノール-クロロホルムで抽出後、エタノール沈殿により回収した。得られたRNA約2.5μgを10mM Tris-HCl (pH 8.0) および1mM EDTAからなる溶液1mlに溶かした。65℃、5分間インキュベートし、0.1mlの5M NaClを加えた。混合物をオリゴ(dT)セルロース・

びdCTP) および10単位のリボスクレアーゼインヒビター (P-L Biochemicals社製) からなる溶液22.3μlに溶解し、10単位の逆転写酵素 (生化学工業社製) を加え、41℃90分間インキュベートし、mRNAに相補的なDNAを合成させた。該反応物をフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、RNA-DNA二重鎖の付加したベクタープライマーDNAを回収した。該DNAを88μM dCTPおよび0.2μgポリ(A)を含むTdT緩衝液20μlに溶かし、14単位のTdT (P-L Biochemicals社製) を加えて37℃2分間インキュベートし、cDNA 3'末端に20個の(dC)鎖を付加した。該反応物をフェノール-クロロホルム抽出し、エタノール沈殿により(dC)鎖の付加したcDNA-ベクタープライマーDNAを回収した。該DNAを10mM Tris-HCl (pH 7.5)、6mM MgCl₂、および60mM NaClからなる液400μlに溶かし、20単位のHindⅢを加え、37

℃カラム [ビー・エル・バイオケミカル (P-L Biochemical) 社製] クロマトグラフィー (カラム体積0.5ml) にかけた。吸着したポリ(A)を有するmRNAを10mM Tris-HCl (pH 7.5) および1mM EDTAからなる溶液で溶出し、ポリ(A)を有するmRNA約100μgを得た。

(2) cDNA合成と該DNAのベクターへの挿入:

オカヤマ-バーグ (Okayama-Berg) の方法 [モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 2, 161 (1982)] に従い、cDNAの合成とそれを組み込んだ組換え体プラスミドの造成を行った。その工程の概略を第14図に示す。

上記で調製したポリ(A) RNA約2μg、ベクタープライマー約1.4μgを50mM Tris-HCl (pH 8.3)、8mM MgCl₂、30mM KCl、0.3mM DTT、2mM dNTP (dATP, dTTP, dGTPおよ

び2時間インキュベートし、HindⅢ部位で切断した。該反応物をフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿して0.5ピコセルの(dC)鎖付加cDNA-ベクタープライマーDNAを得た。該DNA 0.2ピコセルおよび前記のリンカーDNA 0.4ピコセルを10mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.1M NaClおよび1mM EDTAからなる溶液100μlに溶かし、85℃、42℃、0℃でそれぞれ10分、25分、30分間インキュベートした。20mM Tris-HCl (pH 7.5)、4mM MgCl₂、10mM (NH₄)₂SO₄、0.1M KClおよび0.1mM β-NADの組成で、全量100μlとなるよう反応液を調製した。該反応液に25単位の大腸菌DNAリガーゼ (ニューイングランド・バイオラブズ社製) を加え、11℃18時間インキュベートした。該反応液を各40μMのdNTP、0.15mM β-NADとなるよう成分を濃加調整し、10単位の大腸菌DNAリガーゼ、20単位の大腸菌DN

AポリメラーゼI (P-L Biochemicals社製) および10単位の大腸菌リボスクレアーゼH (P-L Biochemicals社製)を加え、12℃、25℃で順次1時間ずつインキュベートした。上記反応で、cDNAを含む組換えDNAの環状化と、RNA-DNA二重鎖のRNA部分がDNAに置換され、完全な二重鎖DNAの組換え体プラスミドが生成した。

③ ヒトLTcDNAを含む組換えDNAの選別：

②で得た組換え体プラスミドを用い、大腸菌C600SP8株(カメロン(Cameron): プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA 72, 3416 (1975))をScottらの方法(重定勝蔵: 細胞工学2, 616 (1983))に従い形質転換した。得られた約30,000個のコロニーをニトロセルロース・フィルター上に固定した。ジェネンテック(Gene Tech)社が単離したヒトLTcDNA(パトリック・ダブリュー

・グレイ(Patrick M. Gray)ら: ネイチャー(Nature) 312, 721 (1984)]の5'非翻訳領域の一部の塩基配列と一致する17merの合成DNA 5'-GATCCCCGGCCTGCCCTG-3'を³²Pで標識したプローブに52℃で強く会合した1菌株を選んだ[グルンSTEIN・ホグネス(Grunstein-Hogness)の方法、プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA 72, 3961 (1975)]。この菌株が持つプラスミドpLT1のcDNAの全塩基配列を、M13ファージを用いたディデオキシ・シーケンス法により決定した。その結果、pLT1のcDNAはヒトLTをコードしていることが判明した。

2) 組換え体プラスミドpLA1の造成 (第37図参照)：

前項の方法によって得たpLT1(4.7Kb)5μgを全量50μlのY-0緩衝液に溶かし、制限酵素XhoII(ベーリンガー・マンハイム社製)

10単位を加えて、37℃で2時間切断反応を行った。次いで、NaClを最終濃度150mMとなるように加え、制限酵素NsiI(ニューイングランド・バイオラブズ社製)10単位を加え、37℃でさらに3時間切断反応を行った。反応液からLGT法によりヒトLT DNAの大部分を含む約750bpのDNA断片(XhoII-NsiI断片)約0.3μgを得た。

別に、pLT1 20μgを200μlのY-50緩衝液に溶かし、制限酵素HaeIII 40単位を加えて、37℃で2時間切断反応を行った。

次いで、NaClを最終濃度150mMとなるように加え、NsiI 40単位を加え、37℃でさらに3時間切断反応を行った。反応液からポリアクリルアミドゲル電気泳動法により、ヒトLTのN末端部分を含む約50bpのDNA断片(HaeIII-NsiI断片)約40ngを得た。

一方、pGEL1(3.4Kb)3μgを全量30μlのY-100緩衝液に溶かし、制限酵素

StuIと制限酵素BglIIそれぞれ6単位ずつを加え37℃で3時間切断反応を行った。

この反応液からLGT法によりAp^r遺伝子を含む約2.3KbのDNA断片(StuI-BglII断片)約1.0μgを得た。

次に上記で得たpLT1由来のXhoII-NsiI断片(約750bp)0.2μgおよびHaeIII-NsiI断片(約50bp)20ngとpGEL1由来のStuI-BglII断片(約2.3Kb)0.6μgを全量20μlのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、この混合液にさらに2単位のT4 DNAリガーゼ(宝酒造社製)を加え4℃18時間反応を行った。

このようにして得た組換え体プラスミドDNAを用い、Escherichia coli KM430株をコーエンらの方法により形質転換し、Ap^rのコロニーを得た。この形質転換株よりプラスミドDNAを公知の方法に従って分離精製し、該プラスミドDNAをStuI等の制限酵素で切断することによりプラスミドの構造解析を行っ

た。その結果、目的のプラスミドが得られたことを確認した。この組換え体プラスミドをpLSA1と呼ぶ。

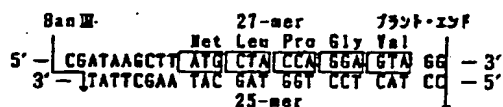
3) LT発現プラスミドpLSA1の造成 (第38図参照) :

前項により得られたpLSA1 (3.1 Kb) をもつ大腸菌KM430株を培養し、培養液から常法によりpLSA1 DNAを調製した。得られたpLSA1 DNA 3μgをY-100緩衝液30μlに溶かし、Stu IとBgl IIそれぞれ3単位ずつを加え37℃で3時間切断反応を行った。この反応液からLGT法によりヒトLT遺伝子の大部分を含む約790bpのDNA断片 (Stu I-Bgl II断片) 約0.5μgを得た。

別に、特開昭58-110800号公報記載の方法で調製したpKYP10 3μgをY-100緩衝液30μlに溶かし、制限酵素Bam IIIと制限酵素Pst Iをそれぞれ6単位ずつを加え37℃で3時間切断反応を行った。この反応液からLGT法によりトリプトファンプロモータ

ー (Ptrp) を含む約1.1 KbのDNA断片 (Bam III-Pst I断片) 約0.8μgを得た。また、pGEL1 (3.4 Kb) 2μgをY-100緩衝液20μlに溶かし、制限酵素Hind III、Bam HIおよびPst Iそれぞれ4単位ずつを加え37℃で3時間切断反応を行った。この反応液からLGT法によりリボプロテイン由来ターミネーターを含む約1.7 KbのDNA断片 (Pst I-Bam HI断片) 約0.7μgを得た。

一方、成熟ヒトLTポリペプチドのN末端であるLeu (CTA) から、5番目のアミノ酸であるGly (GGC) の2番目の塩基 (GG) までと、発現に必要な開始コドン (ATG) を付与する必要があること、またPtrpの下流のSD配列とATGとの距離は、8~18bpの間の適当な長さにする必要があることなどの理由から、下記のDNAリンカーを合成した。

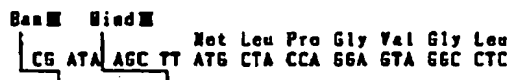


まず、一本鎖DNA、27-merと25-merを通常のトリエステル法により合成した。27-merおよび25-merの各々20ピコモルを全量40μlのT4キナーゼ緩衝液に溶かし、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製) 6単位を加えて、37℃で60分間リン酸化反応を行った。

次に上記で得たpLSA1由来のStu I-Bgl II断片 (約790bp) 0.3μgと発現ベクターpKYP10のBam III-Pst I断片 (約1.1 Kb) 0.4μgおよびpGEL1由来のPst I-Bam HI断片 (約1.7 Kb) 0.8μgをT4リガーゼ緩衝液25μlに溶かし、この混合液に上記DNAリンカーを約1ピコモル加えた。この混合液にさらにT4 DNAリガーゼ6単位を加え、4℃で18時間結合反応を行った。

組換え体プラスミドを含む反応混合物を用いて大腸菌KM430株を形質転換し、Amp^rのコロニーを得た。このコロニーの培養液からプラスミドDNAを回収した。得られたプラス

ミドの構造は制限酵素Eco RI、Bam III、Pst I、Hind III、Bgl IIで切断後、アガロースゲル電気泳動により確認した。このプラスミドをpLSA1とよぶ。pLSA1のBam III、Hind III付近の塩基配列は下記のとおりであることをマキサム・ギルバートの方法 [エイ・エム・マキサム (A. M. Maxam) ら: プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.), USA 74, 580 (1977)] で確認した。



参考例15.

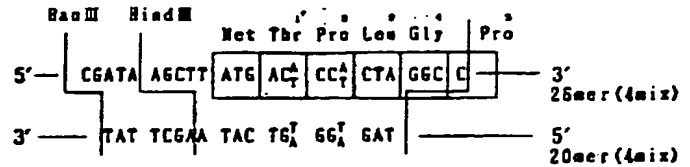
hG-CSF発現プラスミドpCITA1の造成 (第39図参照) :

参考例4により得られたpCSP1-2 DNA 2μgを全量20μlのY-100緩衝液に溶かし、制限酵素Apa I [ベーリンガー・マンハイム (Boehringer Mannheim) 社製] とBam HI それぞ

れ10単位を加え、37℃で4時間反応を行った。
この反応液からLGT法により1.5 KbのDNA
断片0.4μgを精製、回収した。

別に 考例14の方法で調製したプラスミドpL
SA12μgをY-100緩衝液2.0μlに溶かし、
制限酵素Bam III (東洋紡績社製)とBam HI
それぞれ10単位を加え、37℃で4時間反応を
行った。この反応液からLGT法により2.8 Kb
のDNA断片0.8μgを精製、回収した。

一方、成熟hG-CSFポリペプチドのN末端
1番目から5番目までのアミノ酸〔スレオニン¹
(ACAまたはACT)、プロリン²(CCAま
たはCCT)、ロイシン³(CTA)、グリシン⁴
(GGC)、プロリン⁵(CCC)]をコードする
コドンと発現に必要な開始コドン(ATG)を付
与する必要があること、また、トリプトファン
プロモーター(Ptrp)の下流のSD-配列とA
TGとの距離を、8~18bpの間の適当な長さ
にする必要があることなどの理由から、下記のD
NAリンカーを合成した。

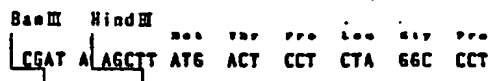


まず一本鎖DNA、26merと20merを通常のト
リエステル法〔アール・クレア(R. Creas)ら:ブ
ロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデ
ミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.),
USA 75, 5765 (1978)]により合成した。26mer、
20merのそれぞれ2μgをT4キナーゼ緩衝液に溶
かし、T4ポリヌクレオチドキナーゼ30単位を加
えて、37℃で60分間リン酸化反応を行った。

上記で得たpCSF1-2由来のApa I -
Bam HI断片(1.5 Kb)0.4μgとpLSA1
由来のBam III-Bam HI断片(2.8 Kb)0.2
μgとを25μlのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、こ
の混合液に上記DNAリンカーを0.1μg加えた。
この混合溶液にさらにT4 DNAリガーゼ6単位
を加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて

大腸菌HB101株〔ボリバー(Bolivar)ら:ジ
ーン(Gene) 2, 75 (1977)]をコーエンらの方
法〔エス・エヌ・コーエン(S. N. Cohen)ら:ブ
ロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデ
ミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad.
Sci.) USA, 69, 2110 (1972)]により形質転
換し、Ap^rのコロニーを得た。このコロニーの
培養固体からプラスミドDNAを回収した。得ら
れたプラスミドの構造は、Bam III、Rsa I、
Pst I、Hind III、Bgl IIで切断後、アガ
ロースゲル電気泳動により確認した。このプラス
ミドをpCfTA1とよみ、pCfTA1のBam
III、Hind III付近の塩基配列は下記のとおりで
あることを、M13ファージを用いたディデオキ
シ・シーケンス法で確認した。



考例16.

pCfBD28の造成:

(1) hG-CSF cDNAの3'-非翻訳領域の一

部を欠失したプラスミドpCfTB20の造成
(第40回参照):

参考例15で得られたhG-CSF発現プラスミ
ドpCfTA1(4.3 Kb)2μgをY-100
緩衝液2.0μlに溶かし、制限酵素Bam HI 4
単位を加えて37℃で4時間消化反応を行った。フ
ェノールクロロホルム抽出の後、エタノール沈
殿により、DNA断片1.8μgを回収した。このD
NA断片をクレノー緩衝液20μlに溶かし、dAT
P、dTTP、dCTP、dGTPをそれぞれ1
mMになるように加え、さらに4単位のDNAポ
リメラーゼI・クレノー断片を加えて、室温で1
時間反応させ、突出末端を平頭末端に変換した。
フェノールクロロホルム抽出後、エタノール沈
殿により、DNA断片1.6μgを回収した。該DN
A断片をY-100緩衝液2.0μlに溶かし、10
単位のEco RIを加え、37℃で4時間切断反応
を行った。この反応液からLGT法により2.5 Kb
のDNA断片〔Bam HI (平頭末端)-Eco R
I断片]1μgを得た。

置換え体プラスミドを含む反応混合物を用いて大腸菌C800SP8 (PERM BP-1078) [カメロン (Cameron)ら: プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.), USA 72, 3416 (1975)] を形質転換し、A⁺のコロニーを得た。この形質転換株よりプラスミドDNAを公知の方法に従って分離・精製した。該プラスミドDNAの構造はPst I, EcoRI, BamHIで切断後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により確認した。このプラスミドを第41図に示したとおりpCITL38とよぶ。上記プラスミド中のhG-CSF遺伝体遺伝子のN末端付近の配列は

Met Ser Pro Leu Gly Pro Ala
pCITL38-ATG AGT CCA CTA GGC CCT GCC

であることをM13ファージを用いたディデオキシ・シーケンス法により確認した。

(3) 置換え体プラスミドpCfWD1の造成 (第42図参照):

参考例15の方法で得たpCfTA1 5μgを50μlのY-100緩衝液に溶かし、制限酵素StuI

dCTP, dGTPをそれぞれ100μMになるように加え、DNAポリメラーゼI・クレノー断片を2単位加え17℃で15分間反応を行った。88℃で10分間処理してDNAポリメラーゼI・クレノー断片を失活させた後、NaClを100mMとなるように加え、制限酵素PstIを5単位加え37℃で1時間消化反応を行った。反応液からLGT法によりppターミネーターを含む約1.8KbのDNA断片[BamHI (平垣末端)-PstI断片]約0.8μgを得た。これとは別に、pGEL1の4μgを40μlのY-100緩衝液に溶かし、制限酵素BamHI (東洋紡績社製) 10単位とPstI 10単位を加え37℃で1時間消化反応を行い、反応液から、LGT法でトリプトファン系プロモーターを含む約1KbのDNA断片(BamHI-PstI断片)を0.4μg得た。

上記で得たpCfTA1由来のBamHI-StuI断片(約1.3Kb)約0.2μg、pKYP26由来のBamHI (平垣末端)-PstI

10単位と、制限酵素BamHI (東洋紡績社製) 10単位を加えて、37℃で1時間消化反応を行った。反応液からLGT法によりhG-CSF cDNAを含む約1.3KbのDNA断片(BamHI-StuI断片)約0.5μgを得た。別に、参考例2の方法で製造したpKYP26 3μgを50μlのY-100緩衝液に溶かし、BamHI 6単位を加えて、30℃で1時間消化反応を行った。

これに10mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM EDTAで飽和したフェノールを等量加え、激しく攪拌した後、低速遠心分離法(3,300 rpm, 10分間, 以下同条件)により水層を養めた。等量のクロロホルムを加え、激しく攪拌した後低速遠心分離法により水層を養めた。1/10容の3M酢酸ナトリウムを加え、2.5倍容のエタノールを加え、-20℃, 1時間静置した。冷却遠心分離法(4℃, 11,000 rpm 10分間)で沈殿を養めた。この沈殿を30μlのクレノー緩衝液に溶かし、dATP, dTTP,

断片(約1.8Kb)約0.1μg、pGEL1由来のBamHI-PstI断片(約1Kb)約0.1μgを30μlのT4 DNAリガーゼ緩衝液に溶かし、4単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃, 18時間結合反応を行った。

該反応液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、A⁺のコロニーを得、このコロニーより鏡記バーンボイムらの方法によりプラスミドDNAを回収し、第42図に示したpCfWD1を得た。

(4) pCfT95K19の造成 (第43図参照)

pCfTL38の5μgを50μlのY-100緩衝液に溶かし、制限酵素HindIIIとBglIIを10単位ずつ加え、37℃で1時間消化反応を行った。反応液からLGT法によりトリプトファン・プロモーターを含む約2.8KbのDNA断片(HindIII-BglII断片)約0.7μgを得た。別にpCfTL38, 100μgを1.5mlのY-100緩衝液に溶かし、制限酵素BamHIとHindIIIを80単位ずつ加え、37℃で

6時間消化反応を行った。反応液からLGT法によりh6-CSPc DNAを含むDNA断片を回収し、ELUTIPY-d (Schleicher & Schuell 社製) で精製した。このDNA断片を90μlのY-150緩衝液に溶かし、制限酵素Dpn I (Boehringer Mannheim社製) 3単位を加え37℃で15分間消化反応を行った。反応液からポリアクリルアミド電気泳動法で、h6-CSPc DNAを含む約300bpのDNA断片(Hind III-Dpn I断片) 約1μgを得た。

別にpCfTB20の10μgを100μlのY-100緩衝液に溶かし、制限酵素Ava I 10単位を加え、37℃で1時間消化反応を行った。フェノール-クロロホルム抽出およびエタノール沈殿でDNAを回収し、30μlのクレノー緩衝液に溶かし、DNAポリメラーゼI・クレノー断片を2単位加え、17℃で30分間反応を行った。68℃で10分間処理しDNAポリメラーゼI・クレノー断片を失活させ、NaClを100mMになるように加え制限酵素Bgl II

10単位を加え37℃で1時間消化反応を行った。反応液からLGT法でLppターミネーター部分を含む約480bpのDNA断片[Ava I (平坦末端)-Bgl II] 約0.3μgを得た。

上記で得た、pCfTL38由来のHind III-Bgl II断片(約2.6Kb) 約0.1μg、pCfTL38由来のHind III-Dpn I断片(約300bp) 約0.2μg、pCfTB20由来のAva I (平坦末端)-Bgl II断片(約480bp) 約0.15μgを30μlのT4 DNAリガーゼ緩衝液に溶かし、4単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、Ap^rのコロニーを得、このコロニーより前記パーンボイムらの方法によりプラスミドDNAを回収し、第43図に示したpCfT95K19を得た。

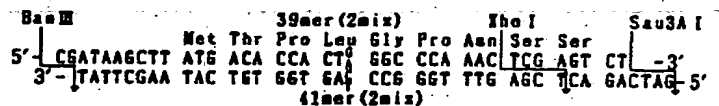
④ pCfAA1の造成(第43図参照)：

前項で得たpCfT95K19 5μgを50μlのY-100緩衝液に溶かし、制限酵素Bam III

(東洋紡績社製) 7単位とBgl II (日本グリーン社製) 2単位を加え、37℃で1時間消化反応を行った。反応液からLGT法によりトリプトファン・プロモーター部分を含む約1KbのDNA断片(Bam III-Bgl II断片) 約0.8μgと、Lppターミネーター部分を含む約1.8KbのDNA断片(Bgl II-Bgl II断片) 約1μgを得た。

これとは別に15μgのpCfT95K19を150μlのY-100緩衝液に溶かし、制限酵素Bgl II (日本グリーン社製) 8単位とSau 3A I 10単位を加え37℃で1時間消化反応を行った。反応液からポリアクリルアミドゲル電気泳動法によりh6-CSPc DNA部分を含む約350bpのDNA断片(Bgl II-Sau 3A I断片) 約0.3μgを得た。

これとは別に、下記のDNA リンカーを合成した。



まず、一本鎖DNA、39-mer と41-merを通常のトリエステル法により合成した。39-mer および41-mer の各々2.0ピコモルを全量40μlのT4キナーゼ緩衝液に溶かし、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造社製) 6単位を加えて、37℃で60分間リン酸化反応を行った。

次に上記で得たpCfT95K19由来のBam III-Bgl II断片(約1Kb) 0.1μg、Bgl II-Bgl II断片(約1.8Kb) 0.05μg、Bgl II-Sau 3A I断片(約350bp) 0.1μgをT4 DNAリガーゼ緩衝液25μlに溶かし、この混合液に上記DNAリンカーを約2ピコモル加えた。さらにT4 DNAリガーゼ6単位を加え、4℃で18時間結合反応を行った。

該反応液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、Ap^rのコロニーを得、このコロニー

より前記バーンボイムらの方法によりプラスミドDNAを回収し、第43図に示したpCfAA1を得た。前記ディデオキシ・シータエンス法でpCfAA1のDNAリンカー部分の塩基配列を決定したところ、4番目のアミノ酸であるLeuをコードするコドン3番目の塩基はAであることが判明した。このpCfAA1ではhG-CSFの10番目のProから23番目のLysまでの14アミノ酸をコードするDNA部分が欠失している。また、hG-CSFの8番目のAlaがAsnに変化する変異が導入されており、新たにXhoIサイトが生じる。

(6) pCfAB5の造成 (第43図参照) :

前項で得たpCfAA1、3μgを30μlのY-100緩衝液に溶かし、制限酵素XhoIを5単位加え、37℃で1時間消化反応を行った。アガロースゲル電気泳動法でXhoI切断が完全に行われていることを確認したのち、制限酵素BglI (日本ジーン社製) を1単位加え、37℃で25分間部分消化反応を行った。反応液か

と2.5-mer、および2.5-merと2.3-merのDNA20ピコモルずつを各々全量40μlのT4キナーゼ緩衝液に溶かし、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製) 8単位を加えて、37℃で60分間リン酸化反応を行った。

次に上記で得たpCfAA1由来のXhoI-BglI断片 (約3Kb) 0.1μg、前項で得たpCfT95K19由来のBglI-Sau3AI断片 (約350bp) 0.1μgをT4 DNAリガーゼ緩衝液30μlに溶かし、この混合液に上記DNAリンカーを2ピコモルずつ加えた。さらにT4 DNAリガーゼ8単位を加え、4℃で18時間結合反応を行った。

該反応液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、Ap^rのコロニーを得、このコロニーより前記バーンボイムらの方法によりプラスミドDNAを回収し、第43図に示したpCfAB5を得た。前記ディデオキシ・シータエンス法でpCfAB5のDNAリンカー部分の塩基配列を決定したところ、17番目のアミノ酸をコ

ーラLGT法によりトリプトファン・プロモーター部分およびppターミネーター部分を含む約3KbのDNA断片 (XhoI-BglI断片) 約1μgを得た。これとは別に、下記のDNAリンカーを合成した。

XhoI	Ser	Ser	Leu	Pro	Gln	Ser	Pro	Leu		
TCG	AGT	CTA	CCA	CAG	AGC	TTC	CT			
	CA	GAT	GGT	GTC	TCG	AAG	GAAAAATT		23mer	
									25mer	

(Cys)										
Ser										
Gly										
	Leu	Lys	Arg	Leu	Glu	Gln	Val	Arg	Lys	
	TTTA	AAA	NGC	TTA	GAG	CAA	GTG	AGG	AA	
			T	NCG	AAT	CTC	GTG	CAC	TCC	TTCTAG
										27mer (4mix)
										25mer (4mix)

(NはG, A, TまたはC)

このリンカーDNAはpCfAA1のhG-CSFcDNAで欠失していたhG-CSFの10番目のProから23番目のLysまでの14アミノ酸をコードするDNA部分を含んでいる。

まず、一本鎖DNA、27-merと25-mer (2種) と23-merを通常のトリエステル法により合成した。たがい相補的な27-mer

をコードするコドンの1番目の塩基はpCfAB5ではAであり、成熟型hG-CSFの17番目のCysが、pCfAB5ではSerに置換していることが判明した。

(7) pCfBA8の造成 (第44図参照) :

前項で得たpCfAB5、3μgを40μlのY-100緩衝液に溶かし、制限酵素AvaI 5単位とBglII 5単位を加え37℃で1時間消化反応を行った。反応液からLGT法により、トリプトファンプロモーター部分とppターミネーター部分を含む約2.8KbのDNA断片 (AvaI-BglII断片) を約1μg得た。

これとは別に、pCfWD1の8μgを50μlのY-100緩衝液に溶かし、制限酵素BglIIを5単位加え、37℃で1時間消化反応を行った。アガロースゲル電気泳動法でBglII切断が完全に行われていることを確認した後に、制限酵素AvaIを3単位加え、37℃で20分間部分切断反応を行った。反応液からLGT法により、hG-CSFcDNAの大部分を含む約

1.3 Kb の DNA 断片 (Bgl II - Ava I 断片) を 0.4 μ g 得た。

次に上記で得た pCfABS 由来の Ava I - Bgl II 断片 (約 2.8 Kb) の 0.1 μ g と pCfWD1 由来の Bgl II - Ava I 断片 (約 1.3 Kb) 0.3 μ g を T4 DNA リガーゼ緩衝液 25 μ l に溶かし、3 単位の T4 DNA リガーゼを加え、4℃で 18 時間結合反応を行った。

該反応液を用いて大腸菌 HB101 株を形質転換し、Ap^r のコロニーを得、このコロニーより前記バーンハイムらの方法によりプラスミド DNA を回収し、第 44 図に示した pCfBA8 を得た。

pCfBA8 のコードする hG-CSF 誘導体のアミノ酸配列は、成熟型 hG-CSF の 6 番目の Ala が Asn に、17 番目の Cys が Ser に置換している。

(四) pCfBD28 の造成 (第 44 図参照) :

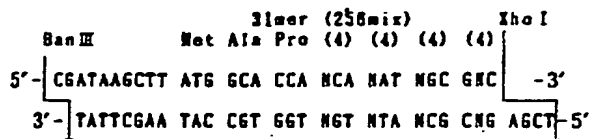
まず、下記の DNA リンカーを合成した。

次に pCfBA8 由来の Ban III - Bgl II 断片 (約 2.7 Kb 断片) 0.1 μ g、同じく pCfBA8 由来の Xho I - Bgl II 断片 (約 1.4 Kb 断片) 0.1 μ g を T4 DNA リガーゼ緩衝液 25 μ l に溶かし、この混合液に上記 DNA リンカーを約 2 ピコモル加えた。さらに T4 DNA リガーゼ 8 単位を加え、4℃で 18 時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて大腸菌 HB101 株を形質転換し、Ap^r のコロニーを得た。このコロニーの培養液からプラスミドを回収し、pCfBD28 を得た。前記ディデオキシ・シーケンス法で DNA リンカー部分の塩基配列を決定したところ、hG-CSF 誘導体の N 末端側の塩基配列は下記の通りであることが判明した。

pCfBD28
Met Ala Pro Thr Tyr Arg Ala
ATG GCA CCA ACA TAT CGC GCC

pCfBD28 がコードする hG-CSF 誘導体は、それぞれ成熟型 hG-CSF に比べて次



33mer (258mix)
(N は G, A, T, C のいずれか一つ)

この DNA リンカーは、4ヶ所の塩基が G, A, T, C のうちのいずれかであり、合計 258 種類の DNA リンカーの混合物として得られる。その結果、この DNA リンカーのコードする hG-CSF の N 末端のアミノ酸配列としては 4ヶ所に 4 種類のアミノ酸の可能性があり、全体として 258 種類のアミノ酸配列が可能であるようにデザインされている。

まず一本鎖 DNA、31-mer と 33-mer を通常のトリエステル法により合成した。31-mer および 33-mer の各々 2 μ g を全量 40 μ l の T4 キナーゼ緩衝液にとかし、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ 30 単位 (宝酒造社製) を加えて、37℃で 60 分間リン酸化反応を行った。

のようにアミノ酸残基が置換されている。

アミノ酸置換の位置 (hG-CSF の 71/酸)	プラスミド pCfBD28
1 番目 (Thr)	Ala
3 番目 (Leu)	Thr
4 番目 (Gly)	Tyr
5 番目 (Pro)	Arg
17 番目 (Cys)	Ser

pCfBD28 にコードされる hG-CSF 誘導体を hG-CSF (ND28) と呼ぶ。

pCfBD28 を含む大腸菌菌株は *Escherichia coli* ECfBD28 (FERMBP-1479) として数工研に寄託してある。

参考例 17

組換え体プラスミド pTkSR18 の造成 :

(1) 組換え体プラスミド pTkSJ1 の造成 :

参考例 8 で得られた pTA4 プラスミド DNA 約 2 μ g を 30 μ l の Y-0 緩衝液に溶かし、10 単位の EcoRI と 30 単位の BbeI を

加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃で、10分間の熱処理後、AFT法を用い、約2.8KbのBbeI-EcoRI断片を精製した。別に、pTA4 DNA約3μgを30μlのY-0緩衝液に溶かし、12単位のKpnIを加え37℃で2時間消化反応を行った。続いて、1.5μlの2M NaClと1単位のEcoRIを加え、さらに37℃で1時間消化反応を行った。この反応により、DNAはKpnIで完全に、EcoRIで部分的に消化された。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用い、約1.4KbのEcoRI-KpnI断片を精製した。また、下記2種の合成DNA (16塩基と24塩基) をアプライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成機を用いて合成し、それぞれ別々に上で述べた方法と同様の方法を用いて5'-リン酸化した。

5'-CTCCTGCTCCCATGG-3'

3'-CGCGGAGGACGGAGGGTACCTTAA-5'

このようにして得られたpTA4由来の約2.8

10分間の熱処理後、AFT法を用い、約0.5KbのDNA断片を精製した。別に、参考例5-②で得られたpTrS33プラスミドDNA約2μgを150mM KClを含むY-0緩衝液に溶かし、8単位のPvuIと15単位のSalIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用い、約1.0KbのDNA断片を精製した。また、参考例8で得られたpTerm2プラスミドDNA約2μgを30μlのY-150緩衝液に溶かし、8単位のPvuIと8単位のNsiI (New England Biolabs 社製) を加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用い、約1.85KbのDNA断片を精製した。また、下記2種の合成DNA (35塩基と31塩基) をアプライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成機を用いて合成し、それぞれを別々に上で述べた方法と同様の方法を用いて5'-リン酸化した。

KbのBbeI-EcoRI断片 (約0.1μg)、pTA4由来の約1.4KbのEcoRI-KpnI断片 (約0.05μg) および5'-リン酸化された2種の合成DNA (それぞれ1pmole ずつ) を20μlのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、50単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA、pTkSJ1を単離し、制限酵素消化による構造解析およびM13ファージを用いたディデオキシ・シーケンス法により、pTkSJ1が目的の構造を有することを確認した (第50図参照)。

④ 組換え体プラスミドpTkSR18の造成:

上で得られたpTkSJ1プラスミドDNA約3μgを30μlのY-100緩衝液に溶かし、10単位のXhoIと15単位のScaIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、

5'-ACTGTGACGTCCCCAGCTGTTCTGAAGGAAATGCA-3'
3'-TGACACTGCAGGGGTCGACAAGACTTCCTTT-5'

このようにして得られたpTkSJ1由来の約0.5KbのXhoI-ScaI断片 (約0.05μg)、pTrS33由来の約1.0KbのPvuI-SalI断片 (約0.1μg)、pTerm2由来の約1.85KbのNsiI-PvuI断片 (約0.1μg)、および5'-リン酸化された2種の合成DNA (それぞれ1pmole ずつ) を20μlのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、50単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

このようにして得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA、pTkSR18を単離し、制限酵素消化による構造解析およびM13ファージを用いたディデオキシ・シーケンス法により、pTkSR18が目的の構造を有することを確認した (第51図参照)。

考例18

pTKSS4の造成:

(1) 組換え体プラスミドpTkSD217の造成:

参考例8で得られたpTA4プラスミドDNA約10 μ gを100 μ lのY-100緩衝液に溶かし、約30単位のXhoIを加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間消化反応を行った。続いて、フェノール抽出およびクロロホルム抽出を行った後、エタノール沈澱によってDNA断片を回収し、50 μ lのTE緩衝液[10mM Tris-HCl (pH7.5)、0.5mM EDTA]に溶かした。このDNA溶液10 μ lに、5倍濃度のBAL31緩衝液[100mM Tris-HCl (pH8.0)、3M NaCl、60mM CaCl₂、60mM MgCl₂、5mM EDTA]を10 μ l、水を30 μ l加え、さらに0.5単位のエキソスクレーゼBAL31(宝酒造社製)を加え、30 $^{\circ}$ Cで5分間反応を行った。この反応条件は、XhoI末端から約0.5KbのDNAが削れる条件

I突出末端を削って平坦末端に変えた。反応をフェノール抽出によって止め、クロロホルム抽出を行った後、エタノール沈澱によってDNA断片を回収した。このDNA断片を30 μ lのY-100緩衝液に溶かし、10単位のBamHIを加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間消化反応を行った。65 $^{\circ}$ C、10分間の熱処理後、AFT法を用い、約2.8KbのDNA断片を精製した。

このようにして得られたpTA4由来の約1.5KbのDNA断片(約0.2 μ g)とpTrS33由来の約2.8KbのDNA断片(約0.1 μ g)とを、全量20 μ lのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、50単位のT4DNAリガーゼを加え、4 $^{\circ}$ Cで18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA pTkSD217を単離し、制限酵素消化による構造解析を行うとともに、大腸菌トリプトファンプロモーター(Ptrp)の下流の塩基配列をM

である。この反応をフェノール抽出によって止め、さらにクロロホルム抽出を行った後、エタノール沈澱によりDNA断片を回収した。このDNA断片を30 μ lのY-100緩衝液に溶かし、10単位のBamHIを加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間消化反応を行った。85 $^{\circ}$ C、10分間の熱処理後、AFT法を用い、約1.5KbのDNA断片を精製した。

これとは別に、pTrS33プラスミドDNA(参考例5)約2 μ gを30 μ lのY-0緩衝液中で約12単位のSacIを加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間消化反応を行った。フェノール抽出とクロロホルム抽出の後、エタノール沈澱によってDNA断片を回収し、全量40 μ lの50mM Tris-HCl (pH7.8)、7mM MgCl₂、6mM 2-メルカプトエタノール、0.25mM dATP、0.25mM dCTP、0.25mM dGTPおよび0.25mM dTTPを含む緩衝液(以下、「ポリメラーゼ緩衝液」と略称する)に溶かし、8単位のクレノー断片(Klenow PolI)(宝酒造社製)を加え、15 $^{\circ}$ Cで1時間反応させ、Sac

13ファージを用いたディデオキシ・シーケンス(dideoxy sequence)法によって決定した。その結果、pTkSD217は目的の構造を有しており、かつ塩基配列は

	ClaI	HindIII		179	180	181	182
				Not	Asp	Cys	Tyr
...	AT	CGATA	AGCTT	ATG	GAC	TGC	TAC
							TTT
							...

クラング2(K2)

であることを確認した(第52図参照)。

(2) 組換え体プラスミドpTkSL11の造成:

上で得られたpTkSD217プラスミドDNA約3 μ gを30 μ lのY-100緩衝液に溶かし、10単位のHindIIIと15単位のScaIを加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間消化反応を行った。65 $^{\circ}$ C、10分間の熱処理後、AFT法を用い、約0.23KbのDNA断片を精製した。次に、参考例5で得られたpTerm2プラスミドDNA約2 μ gを30 μ lのY-100緩衝液に溶かし、10単位のHindIIIと10単位のNotI(ニュー・イングランド・バイオラブズ社製)を加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間消化反応を行った。65 $^{\circ}$ C、10分間の熱処理後、AFT法を用い、

約2.8 KbのDNA断片を精製した。また、下記2種の合成DNA (35塩基と31塩基)をアプライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成機を用いて合成し、それぞれ別々に上で述べた方法を用いて5'-リン酸化した。

5'-ACTGTGACGTCCCCAGCTGTTCTGAAGGAAATGCA-3'
3'-TGACACTGCAGGGGCTCGACAAGACTTCCTTT-5'

このようにして得られたpTkSD217由来の約0.23 KbのDNA断片 (約0.01 µg)、pTerm2由来の約2.8 KbのDNA断片 (約0.1 µg)、および5'-リン酸化された2種の合成DNA (1ピコモルずつ)を全量20 µlのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、300単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA、pTkSL11を単離し、制限酵素消化による構造解析およびM13ディデオキシシ-

ークエンス法による塩基配列決定を行ったところ、pTkSL11は目的の構造を有することを確認した (第53図 参照)。

(3) 組換えプラスミドpTkSS4の造成:

参考例1で得られたpTPA7プラスミドDNA約2 µgを30 µlのY-100緩衝液に溶かし、12単位の制限酵素ScaIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約2.0 KbのDNA断片を精製した。一方、上で得られたpTkSL11プラスミドDNA約2 µgを上と同様の反応に供し、65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約2.0 KbのDNA断片を精製した。

このようにして得られたpTPA7由来の約2.0 KbのDNA断片 (約0.1 µg)とpTkSL11由来の約2.0 KbのDNA断片 (約0.1 µg)を20 µlのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、T4 DNAリガーゼ300単位を加え、4℃で18時間結合反応を行った。

10分間の熱処理後、AFT法を用いて約0.2 KbのDNA断片を精製した。

このようにして得られたpTkSS4由来の約3.3 KbのDNA断片 (約0.1 µg)とpTkSR18由来の約0.2 KbのDNA断片 (約0.01 µg)を20 µlのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、T4 DNAリガーゼ100単位を加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA、pTG3を単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、pTG3が目的の構造を有することを確認した (第55図参照)。

参考例20.

組換えプラスミドpPhPA2の造成:

参考例19で得られたpTG3プラスミドDNA約2 µgをY-100緩衝液30 µlに溶かし、10単位のEcoRIとPvuIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA、pTkSS4を単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、pTkSS4が、目的の構造を有することを確認した (第54図参照)。

参考例19.

組換えプラスミドpTG3の造成:

参考例18で得られたpTkSS4プラスミドDNA約2 µgを30 µlのY-0緩衝液に溶かし、10単位の制限酵素NarI (ニューイングラン・バイオラプス社製)を加え、37℃で2時間消化反応を行った。続いて1.0 µlの2 M NaClと12単位のBamHIを加え、さらに37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約3.3 KbのDNA断片を精製した。一方、参考例17で得られたpTkSR18プラスミドDNA約3 µgを上と同一の反応に供し、65℃、

間の熱処理後、ATF法を用いて約1.7 KbのDNA断片を精製した。

また、考例12で得られたpUKB101プラスミドDNA約2 µgをY-100緩衝液30 µlに溶かし、10単位のNcoIとPvuIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃で、10分間の熱処理後、ATF法を用いて約3.0 KbのDNA断片を精製した。

さらに、参考例17で得られたpTkSR18プラスミドDNA約2 µgをY-100緩衝液30 µlに溶かし、10単位のHindIIIとAatIIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃で、10分間の熱処理後、ATF法を用いて約0.55 KbのDNA断片を精製した。

また、下記4種の合成DNA (37塩基と41塩基および41塩基と45塩基) をアプライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成機を用いて合成した。

5'-CCCCAGCTGTTCTGAAGGAAATAGTGACTGCTATGAG-3' (37塩基)
 3'-TGCAAGGGGTCGACAAGACTTCCTTTATCACTGACGATACTC-5' (41塩基)
 5'-GGGAATGGTCACCTTTTACCAGGAAAGGCCAGCACTGACAC-3' (41塩基)
 3'-CCCTTACCAGTGAAATGGCTCCTTTCCGGTCGTGACTGTGGTAC-5' (45塩基)

これらの合成DNAを20ピコモル (picoles)

ずつ別々に、20 µlのT4キナーゼ緩衝液中で5単位のT4 DNAキナーゼ (宝酒造社製) を加え、37℃で30分間反応させることにより、合成DNAの5'末端をリン酸化した。

このようにして得られたpTG3由来の約1.7 KbのDNA断片 (約0.05 µg)、pUKB101由来の約3.0 KbのDNA断片 (約0.05 µg)、pTkSR18由来の約0.55 KbのDNA断片 (約0.05 µg)、および5'リン酸化された4種の合成DNA (1ピコモルずつ) を全量20 µlのT4リガーゼ緩衝液に溶かし300単位のT4リガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用い

て、大腸菌MM294株を形質転換し、A_p耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA、p_hPA2を単離し、制限酵素消化による構造解析およびM13ディデオキシ・シーケンス法による塩基配列決定を行ったところ、p_hPA2は目的の構造を有することを確認した (第5.6図参照)。

発明の効果

本発明によればプロテアーゼ抵抗性、熱安定性などの性質を付与したポリペプチドが組換えDNA技法により工業的に供給される。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、N-グリコシド結合型糖鎖の分類を示す。

図中記号はそれぞれ下記物質を示す (以下同じ)。

Glc: グルコース、Man: マンノース、
 GlcNAc: N-アセチルグルコサミン、
 Gal: ガラクトース、Sia: シアル酸、
 Fuc: フコース

第2図は、リビド中間の構造を示す。

図中PPはピロリン酸を示す。

第3図は、トリコールリン酸サイクルを示す。

図中記号はそれぞれ下記物質を示す。

P ~ ~ : トリコール酸、P-P ~ ~ : リコールピロリン酸、GDP: グアニジン二リン酸、
 UDP: ウリジン二リン酸、◇: グルコース、
 ▽: マンノース、●: N-アセチルグルコサミン

第4図は、N-グリコシド結合型糖鎖の生合成系を示す。

図中記号はそれぞれ下記物質を示す。

■: N-アセチルグルコサミン、○: マンノース、
 ●: ガラクトース、◇: シアル酸、▲: グルコース、
 △: フコース

第5図は、プラスミドpAS28の造成工程を示す。

第6図はプラスミドpASN6の造成工程を示す。

第7図(1)図はプラスミドp198028CN145の造成工程を示す。

第7図(2)図はプラスミドpASN145の造成工

程を示す。

第8(1)図は、大腸菌で生産、精製したhG-CSPおよびhG-CSP [ND28]とCHO細胞で生産させたhG-CSP、hG-CSP [ND28]、hG-CSP [ND28N6] およびhG-CSP [ND28N145]をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動に供した後、銀染色したものである。

第8(2)図は、第8(1)図に示したゲル上の蛋白質をニトロセルロース膜に移した後、抗hG-CSP単クローン抗体を用いて酵素抗体染色を行ったものである。

第8(3)図は、第8(2)図の模式図である。

第8(4)図は、hG-CSP [ND28] について、O-グリコシル結合型糖鎖が新たに付加したものと、そうでないものについてキモトリブシン抵抗性を調べたときのSDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果とその模式図を示す。

第8(5)図は、hG-CSP [ND28N8] について、N-グリコシル結合型糖鎖が新たに付加

したものと、そうでないものについてキモトリブシン抵抗性を調べたときのSDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果とその模式図を示す。

第8(6)図は、hG-CSP [ND28N145] について、O-グリコシル結合型糖鎖あるいはN-グリコシル結合型糖鎖が新たに付加したものとそうでないものについてキモトリブシン抵抗性を調べたときのSDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果とその模式図を示す。

第8(7)図は、hG-CSP [ND28N6] についてN-グリコシル結合型糖鎖が新たに付加したものと、それを除去したものについて熱安定性を比較したものである。○印はN-グリコナーゼ処理(N-グリコシル結合型糖鎖除去hG-CSP [ND28N6])を、●印は対照(N-グリコシル結合型糖鎖付加hG-CSP [ND28N6])を示す。

第9図は1本鎖pUKmpS1の造成工程を示す。

第10図はプラスミドpUKS1の造成工程を

示す。

第11図はプラスミドpSE1UKS1-1dの造成工程を示す。

第12図は天然型pro-UKとUK誘導体UK-S1のトロンビン感受性を比較したSDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果を示す。

第13図は天然型pro-UKとUK誘導体UK-S1のトロンビン感受性をアミドリアック活性で比較した結果を示すグラフである。

第14図(1)と(2)は、オカヤマ・バーグ法によるcDNA合成と該DNAを含む組換え体プラスミドの造成工程を示す。

第15図はプラスミドpCCK1の造成工程を示す。

第16図はプラスミドpCCK2の造成工程を示す。

第17図はヒトpro-UK cDNAを運ぶプラスミドpUK11の造成工程を示す。

第18図はプラスミドpTrS20の造成工程を示す。

第19図はプラスミドpTrS33の造成工程を示す。

第20図はプラスミドpTerm2の造成工程を示す。

第21図はプラスミドpTSP10の造成工程を示す。

第22図はプラスミドpTA4の造成工程を示す。

第23図はプラスミドpAGE105Mの造成工程を示す。

第24図はプラスミドpAGE106の造成工程を示す。

第25図はプラスミドpSE1PA1-5の造成工程を示す。

第26図はプラスミドpSE1PA1-9の造成工程を示す。

第27図はプラスミドpUC19Hの造成工程を示す。

第28図はプラスミドpSE1PA1-9Aの造成工程を示す。

第29図はプラスミドpSE1PA1SE1dbfr1-9Aの造
成工程を示す。

第30図はプラスチッドPSE1GC3-3の造
成工程を示す。

第31図はプラスミドpAS3-3の発成工程を示す。

第32圖はプラスミドUKA2の造成工程を示す。

第33圖はプラスミドpUKB101の造成工程を示す。

第34図はプラスミヤUKF2の造成功程を示す。

第35図はプラスミドpUKF proの産成工程を示す。

第38図はプラスミヤpSE1UKprol-1Aの産成工程を示す。

第37図はプラス：PpLA1の造成工程を示す。

第38図はプラスミヤPLSA1の造成工程を示す。

示す。

第48面はプラスミドpSEUKS3の造成工程を示す。

第4.9図は天然型 pro-UK および糖鎖付加型修飾 UK-S3 の 70℃ における熱失活曲線を示す。

第50図はプラスミドpTKSJ1の造成工程を示す。

第51図はプラスミヤドTKSR18の造成工程を示す。

第52図はプラスミドpTKSD2.17の造成工程を示す。

第53圖はプラスティックSL11の造成工程を示す。

第54図はプラスミドpTKSS4の造成工程を示す。

第55図はプラスミマTG3の造成工程を示す。

第56図はプラスミドp h P A 2の造成工程を示す。

第39図はプラスミヤpCITAIの造成工程を示す。

第40図はプラスミドpCITB20の造成工程を示す。

第41図はプラスミドpCITL38の産成工程を示す。

第42図はプラスミヤpCfWD1の造成工程を示す。

第43図はプラスミヤpCfT95K19、
pCfAA1およびpCfAB5の遺伝工程を示
す。

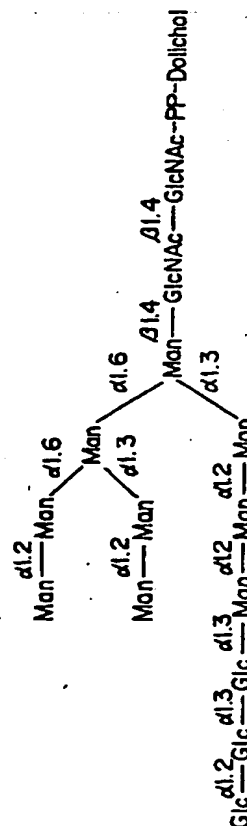
第44図はプラスミドpCfBA8およびpCfBD28の造成工程を示す。

第45図は天然型 pro-UK および糖鎖付加型修飾 UK-S1 の持続注入時における全身漏液系因子のレベルの時間的変化を示す。

第46図は天然型 pro-UK および糖鎖付加型修飾 UK-S1 の急速静注時における全身雄豚因子のレベルの時間的变化を示す。

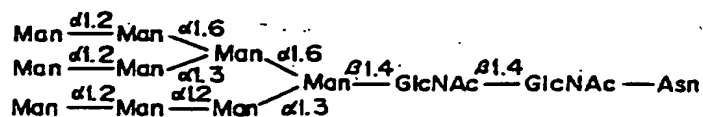
第47図のプラスミドpUKS3の造成工程を

圖 2 部

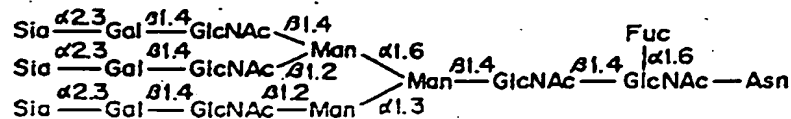


第 1 図

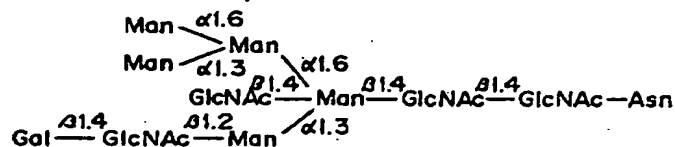
高マンノース型 : (代表例)



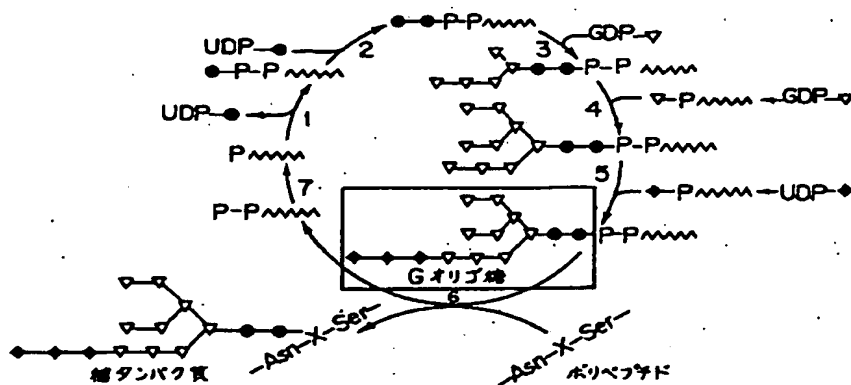
複合型 : (代表例)



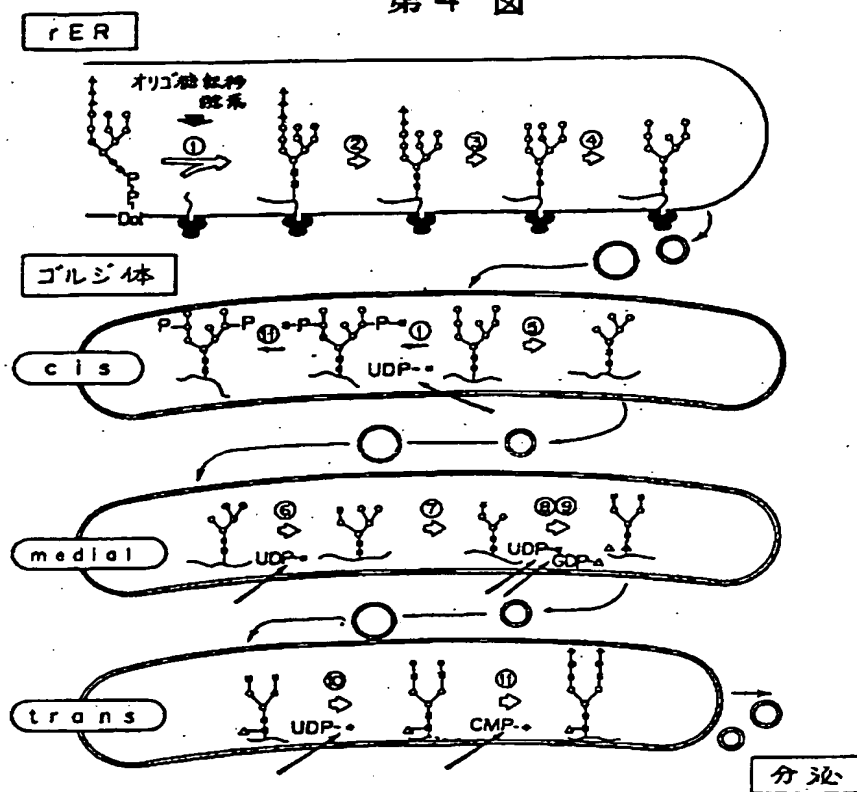
ハイブリッド型 : (代表例)



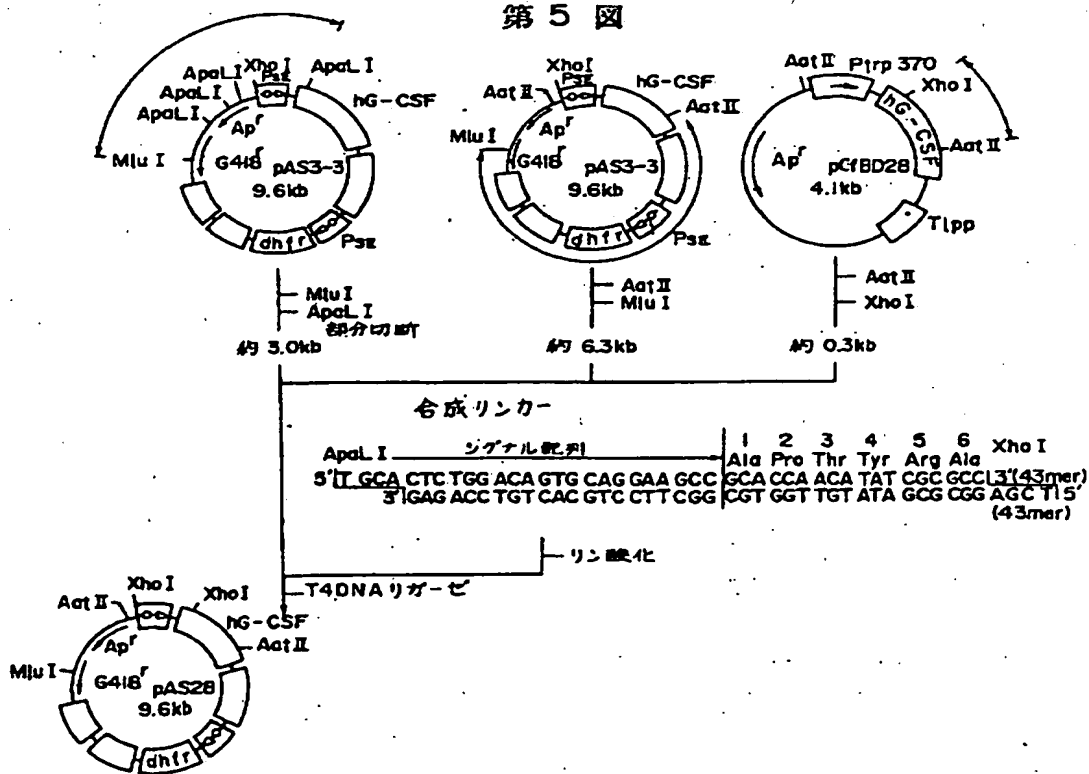
第 3 図



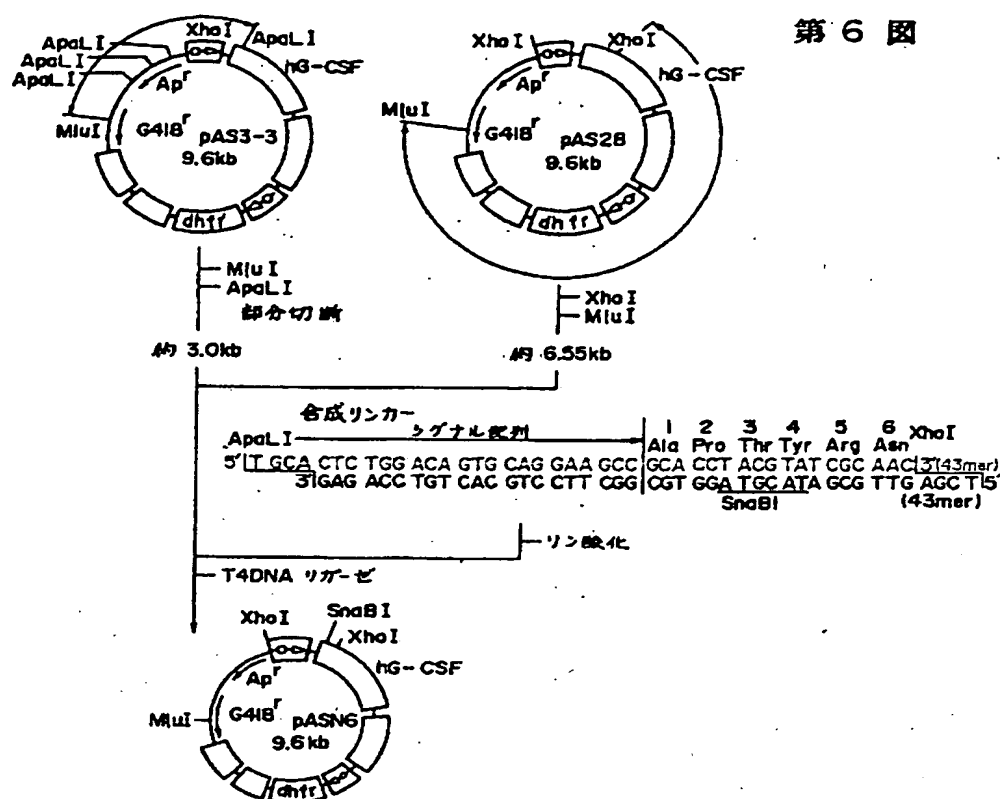
第 4 図



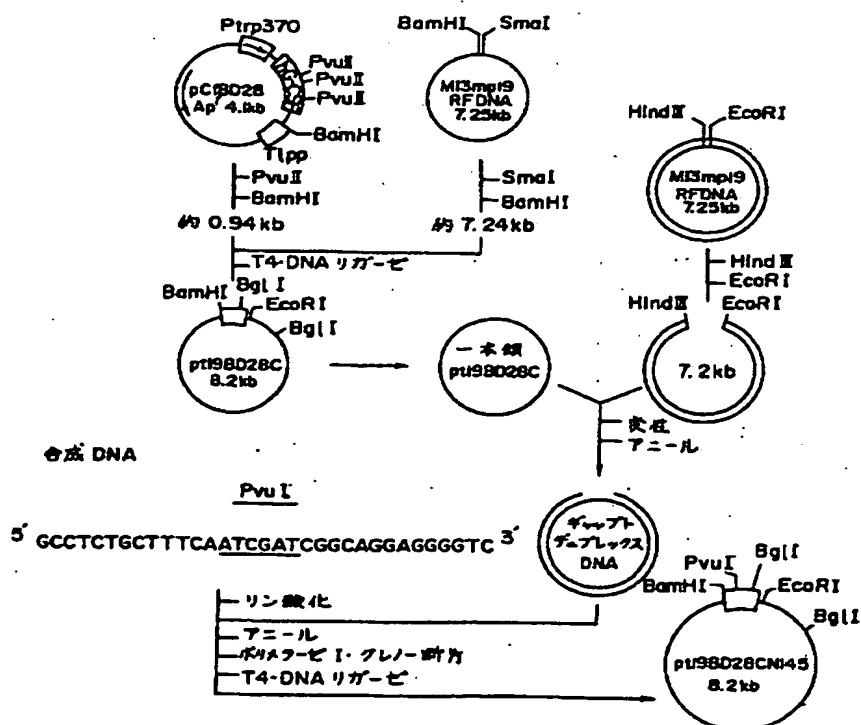
第 5 図



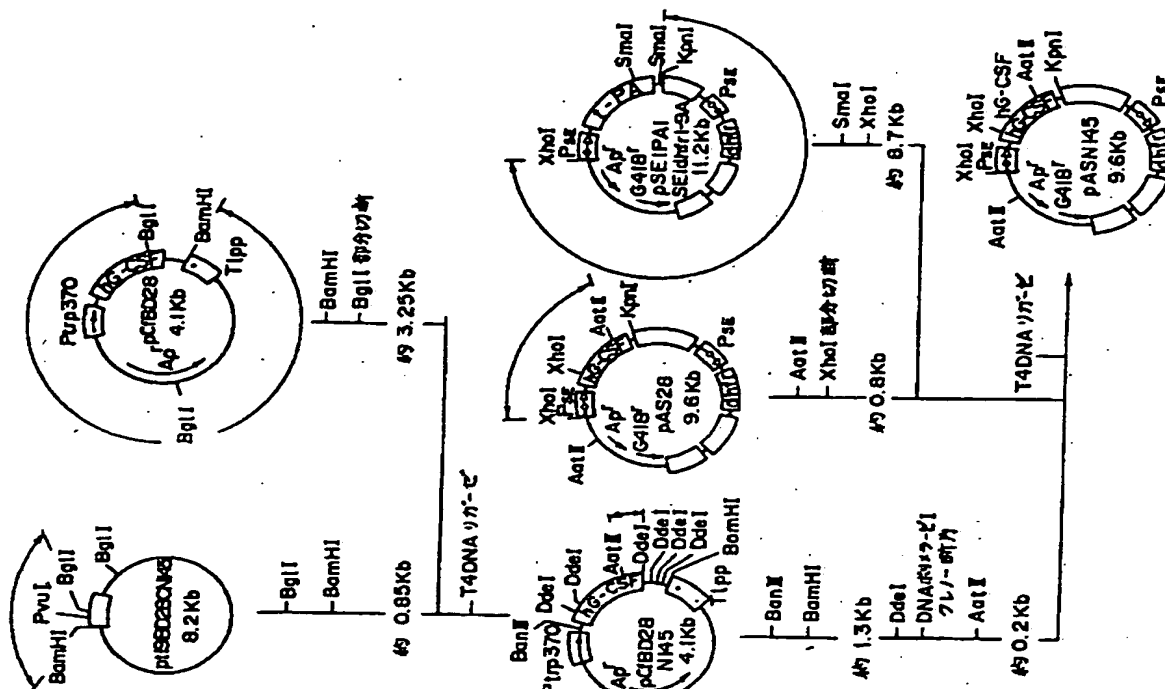
第 6 図



第 7(1) 図



第7(2)図

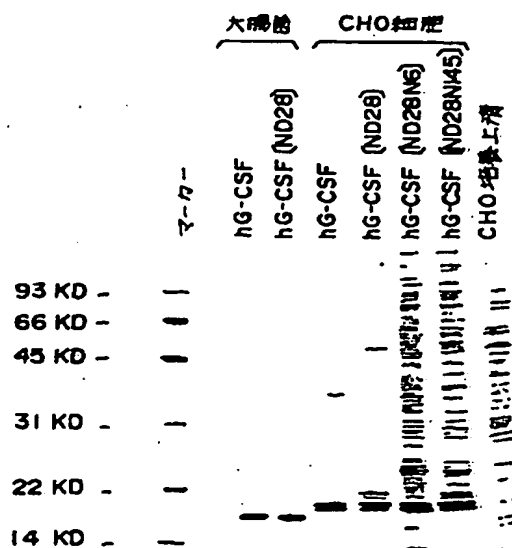


図面の浄書(内容に変更なし)

第8(2)図

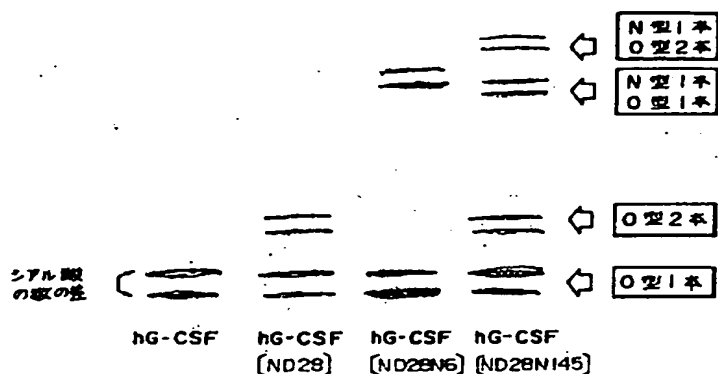


第8(1)図

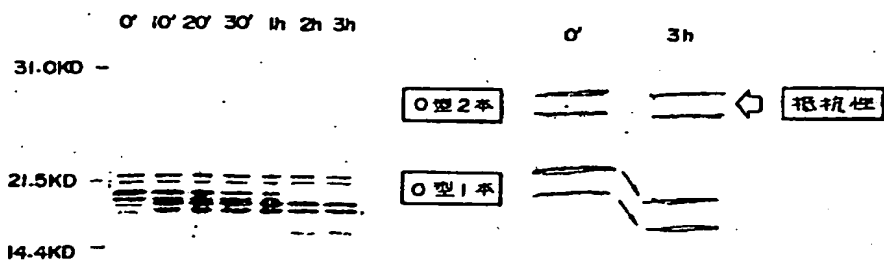


図面の淨意(内容に変更なし)

第8(3)図

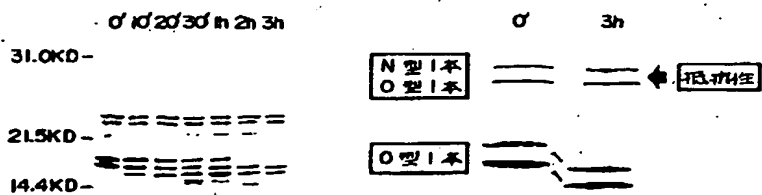


第8(4)図

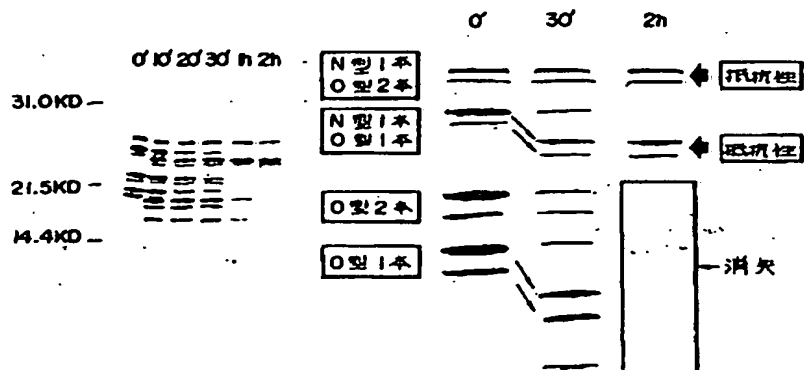


図面の淨意(内容に変更なし)

第8(5)図

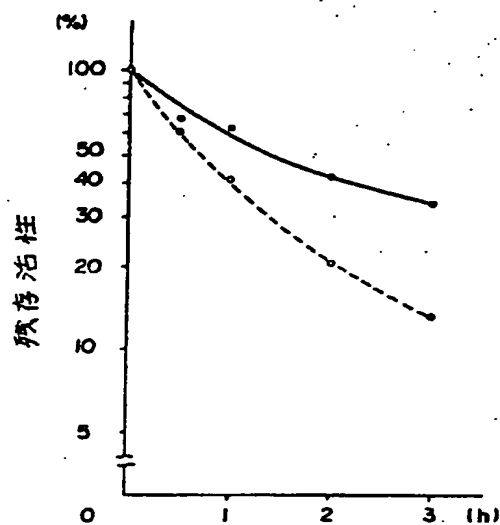


第8(6)図

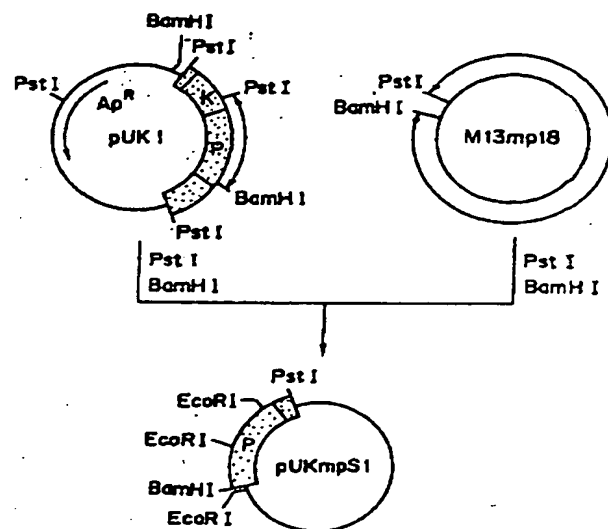


図面の符号(内容に変更なし)

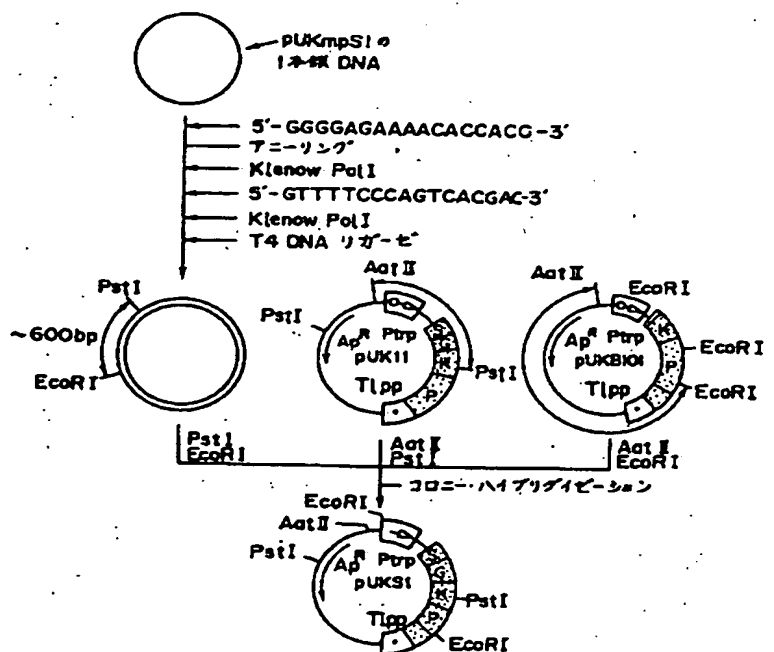
第8(7)図



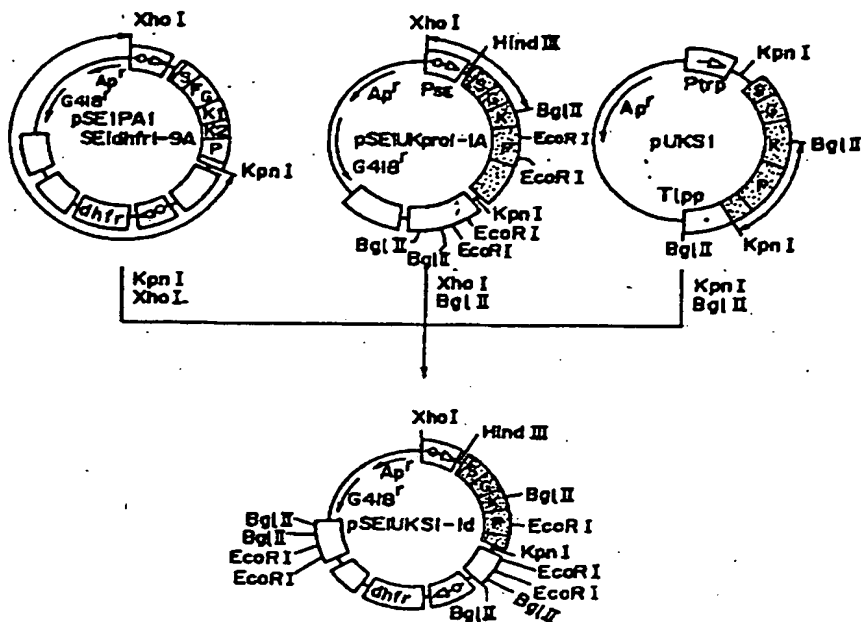
第9図



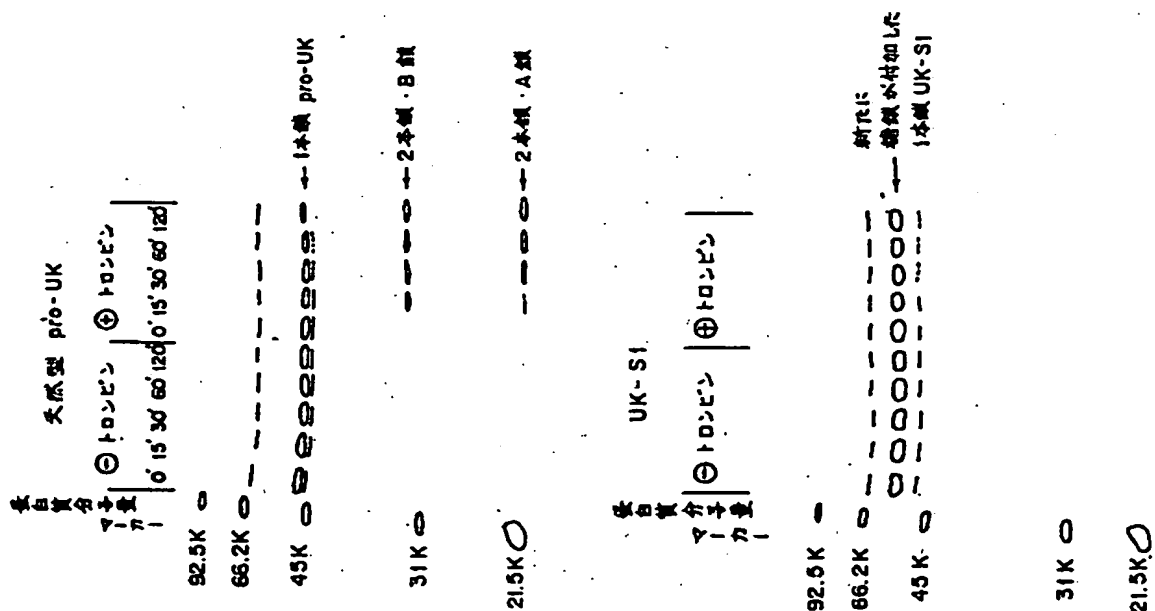
第10図



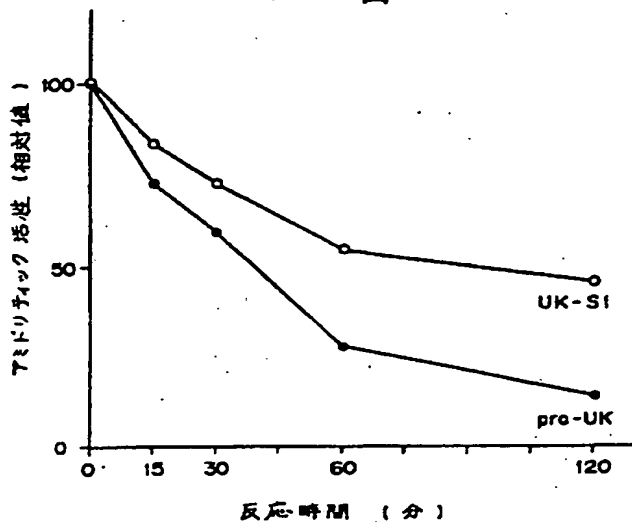
第 11 図



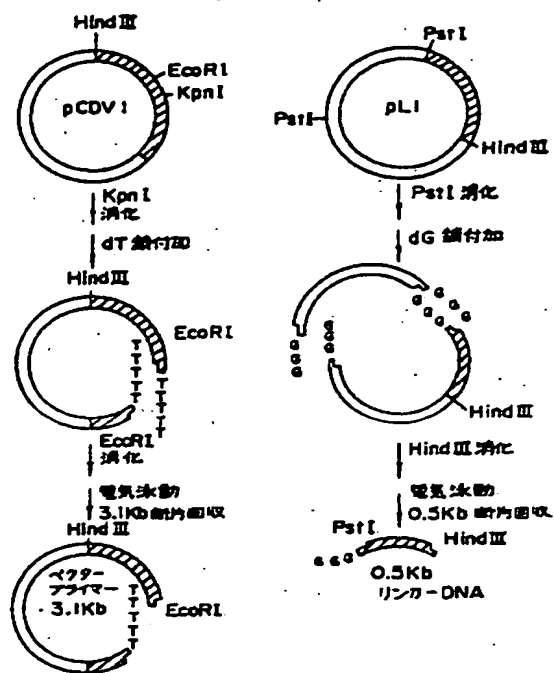
第 12 図



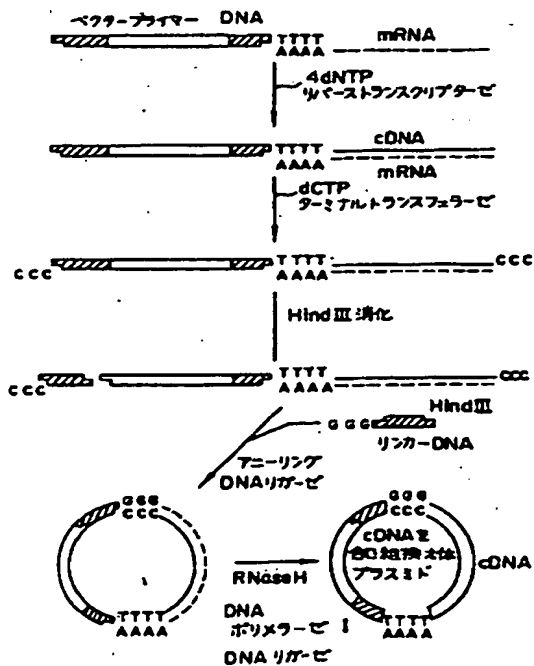
第13 図



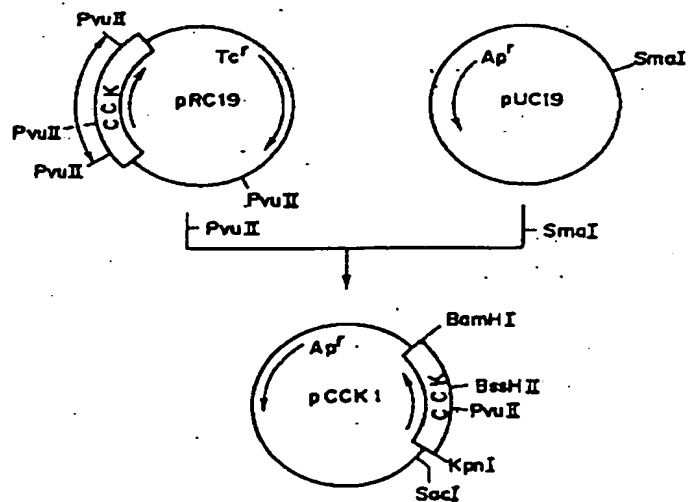
第14 図(1)



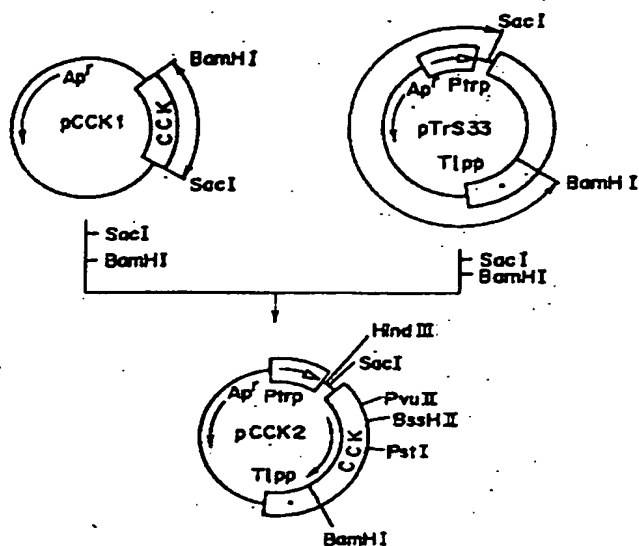
第14 図(2)



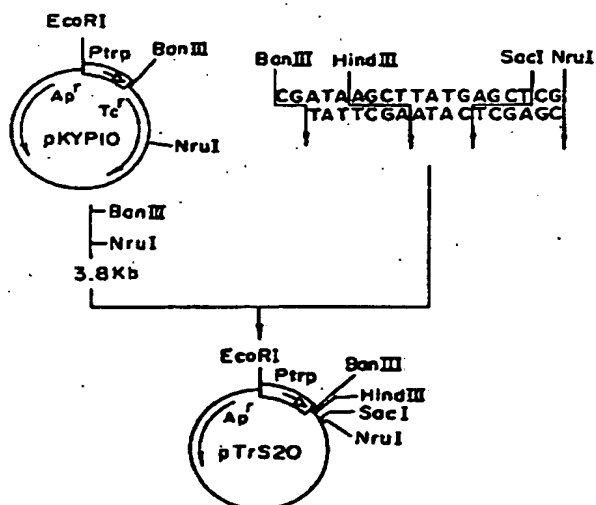
第15 図



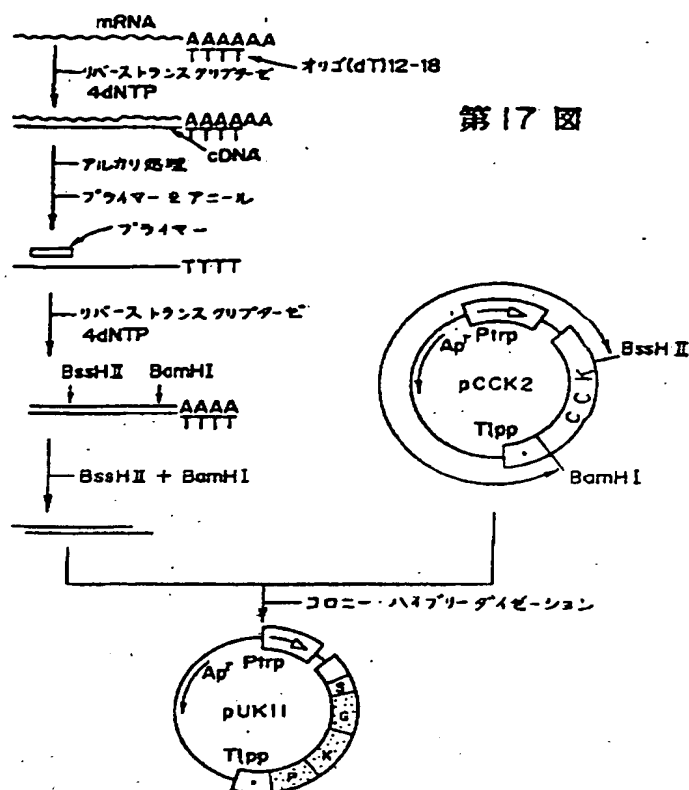
第16図



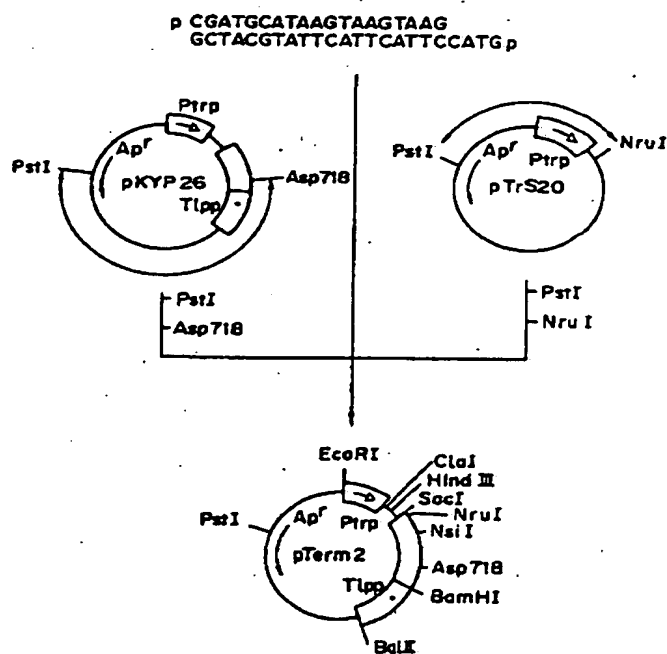
第18図



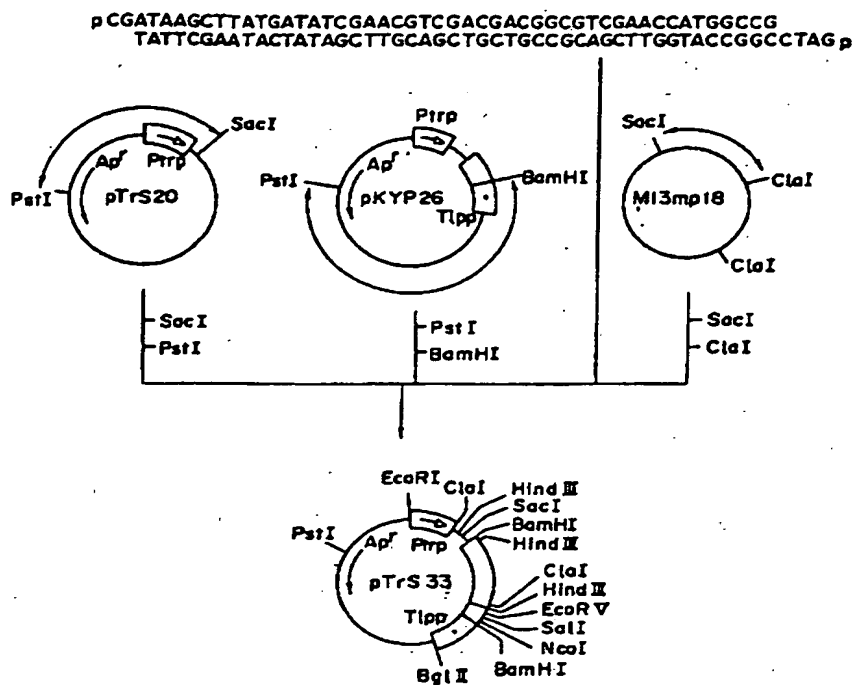
第17図



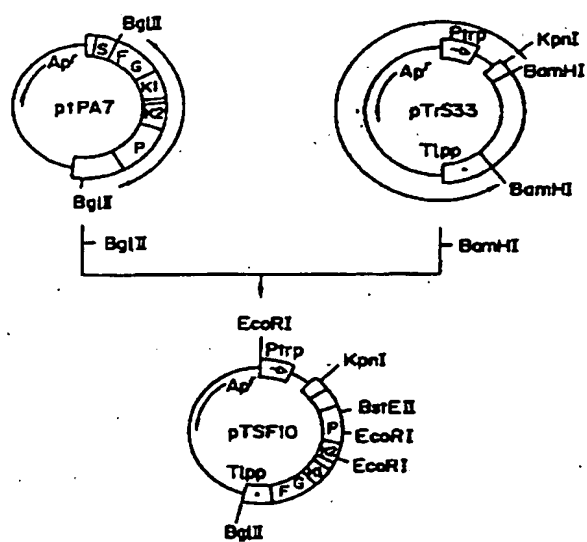
第20図



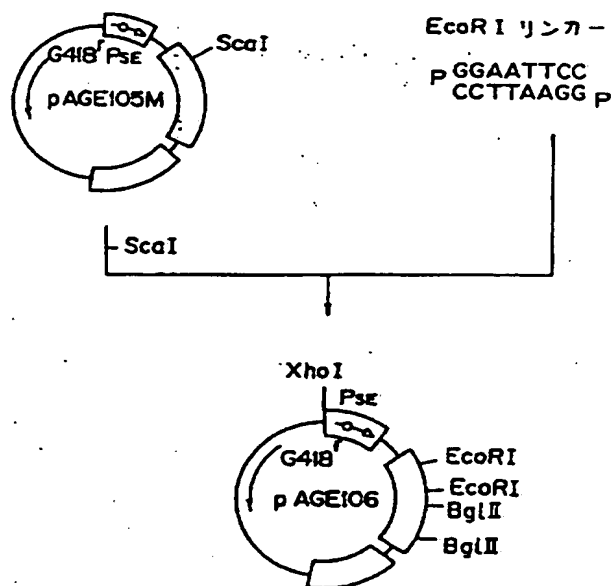
第19 図



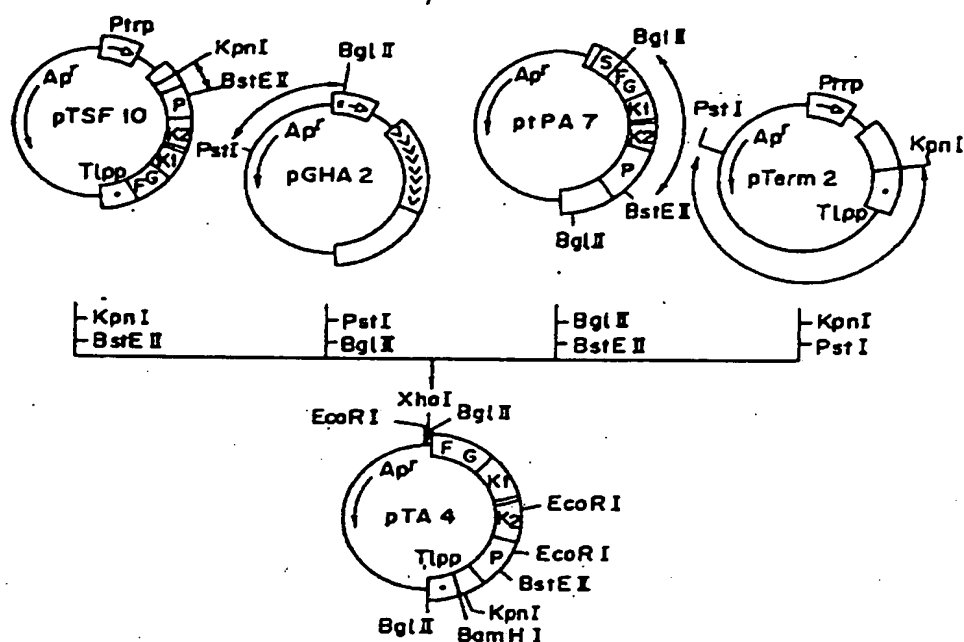
第21 図



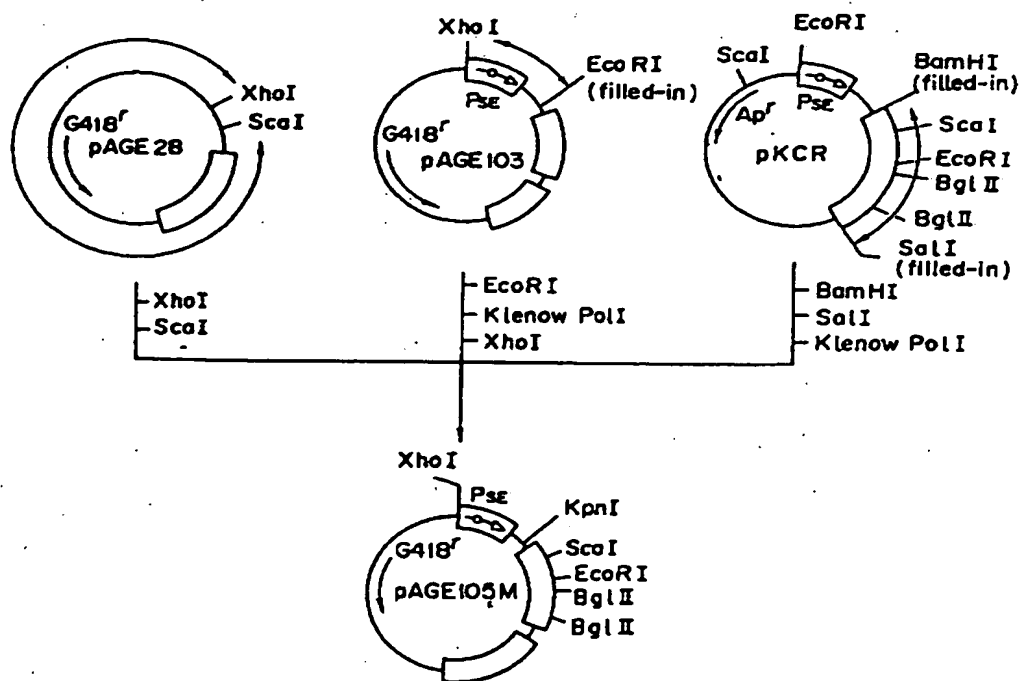
第24 図



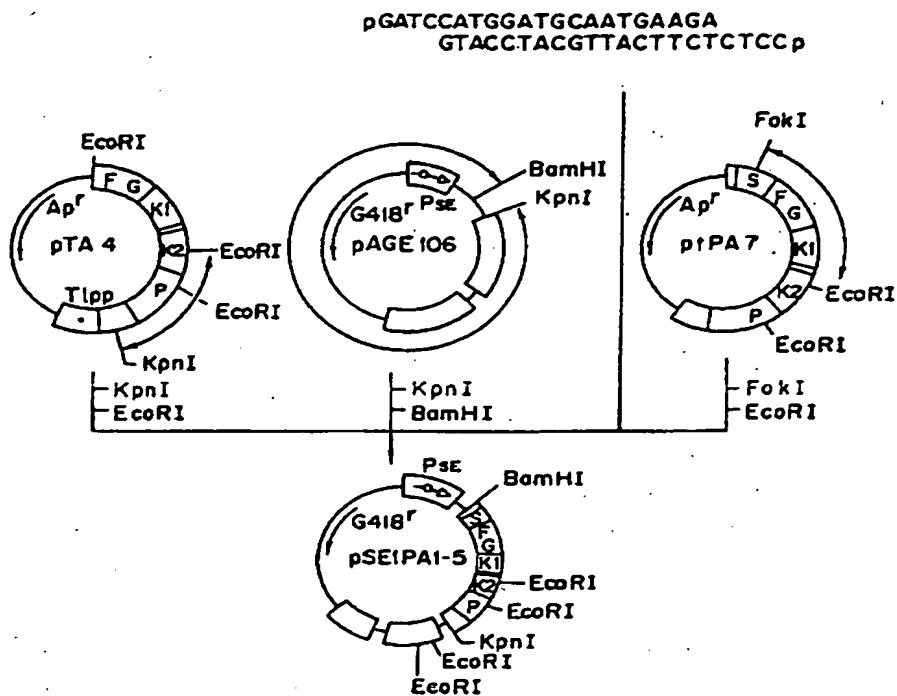
第 22 図



第 23 図

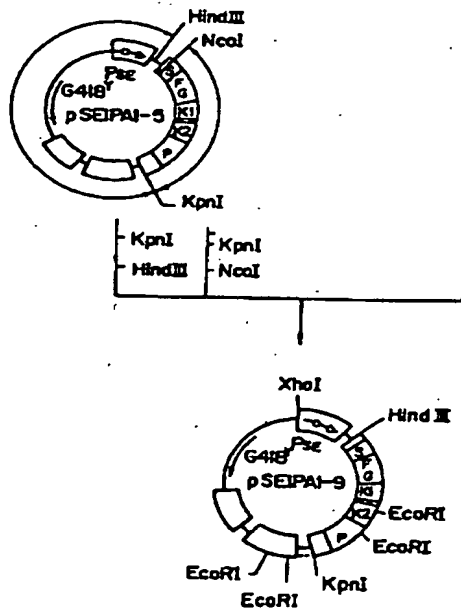


第25図

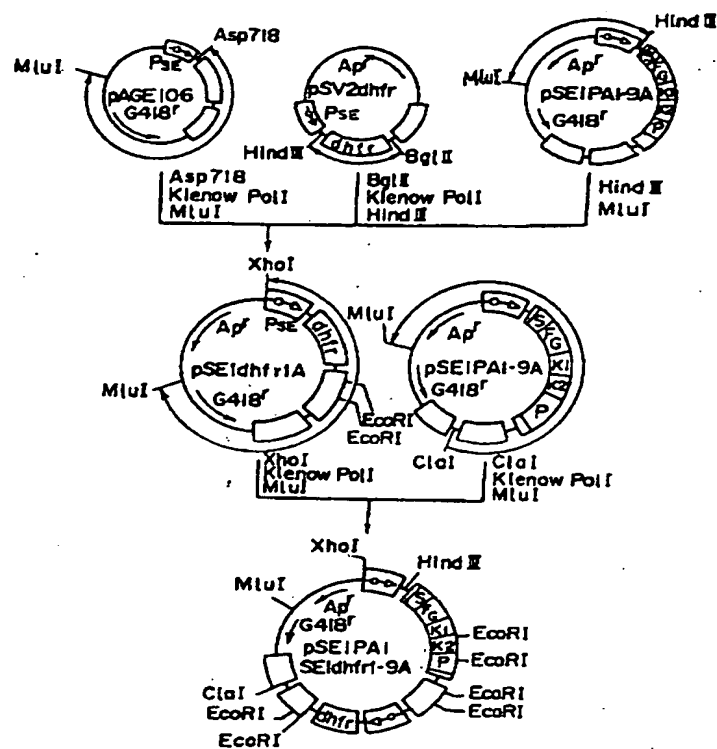


第26図

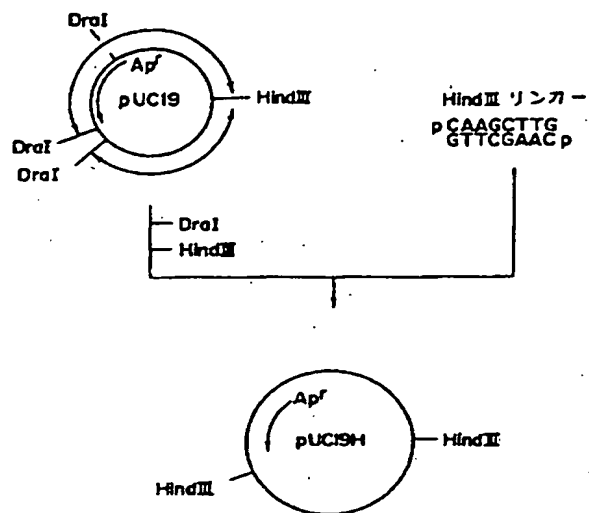
p AGCTTGAGATCCTACAGGAGTCCAGGGCTGGAGAGAAAAACCTCTGCG
ACTCTAGGATGTCCTCAGGTCCGACCTCTCTTTTGGAGACGCTCCTTTT p
pAGGAAAGGGGAGGAGCAAGCGTGAATTTAAGGGACGCTGTGAAGCAAT
CCCTTCCTCGTTCGGCACTTAAATTCCTGCGACACTTCGTTAGTACp



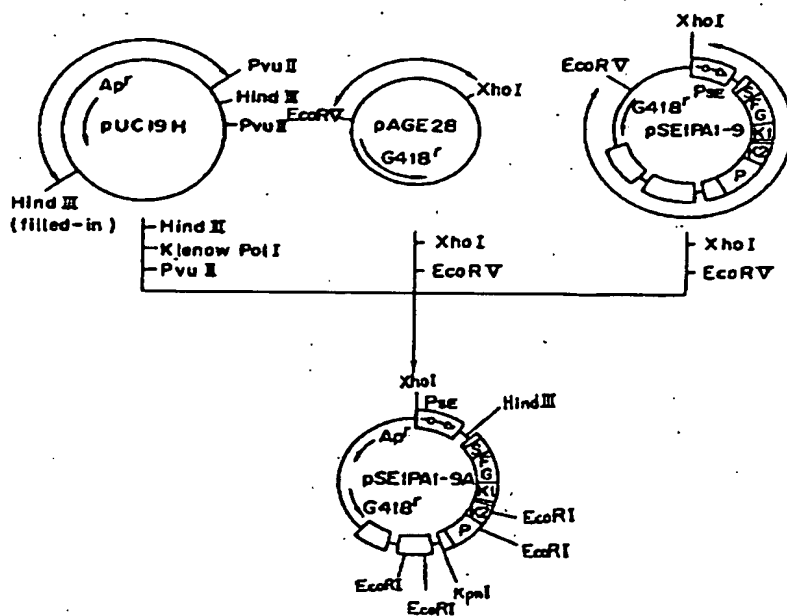
第29図



第27図

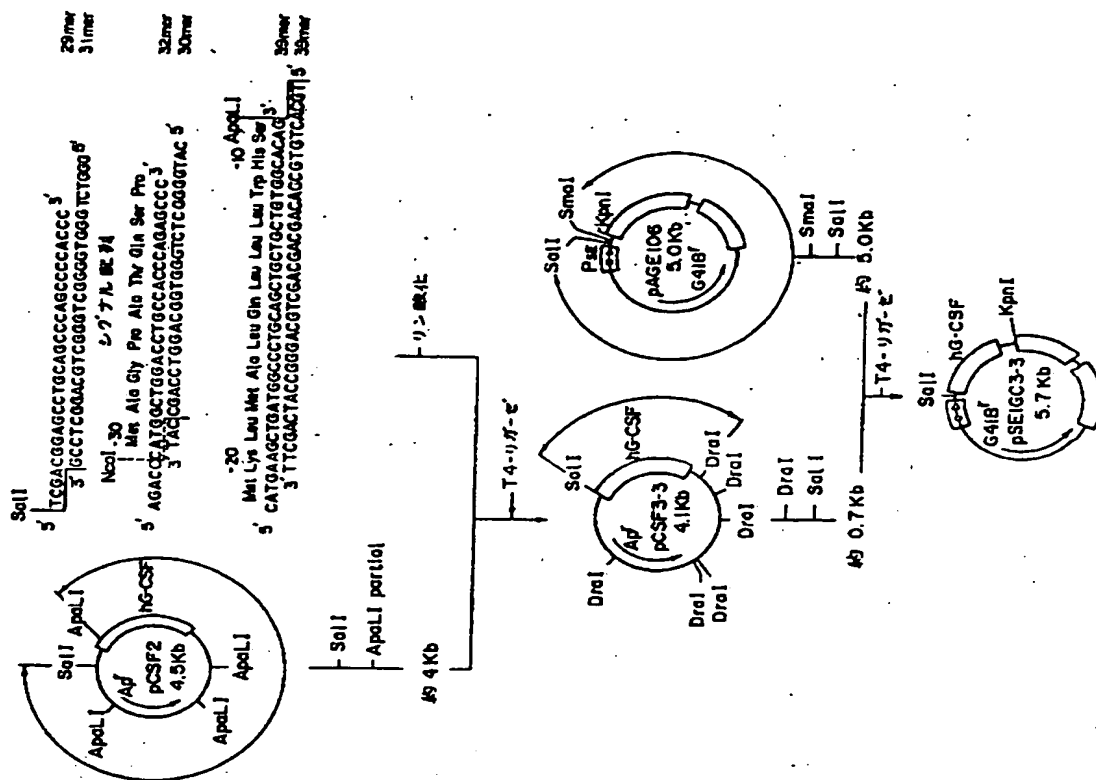


第28図

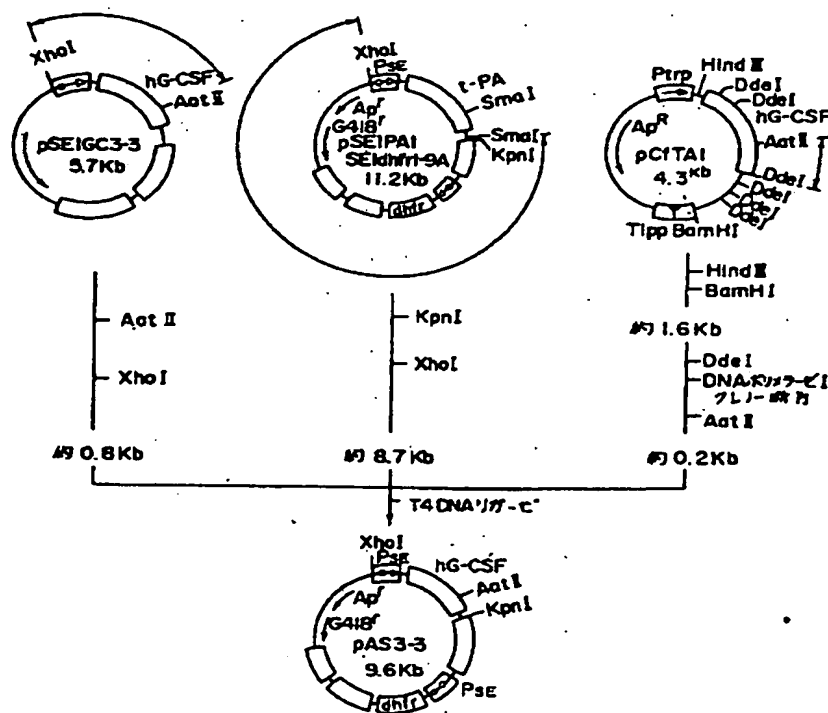


第30圖

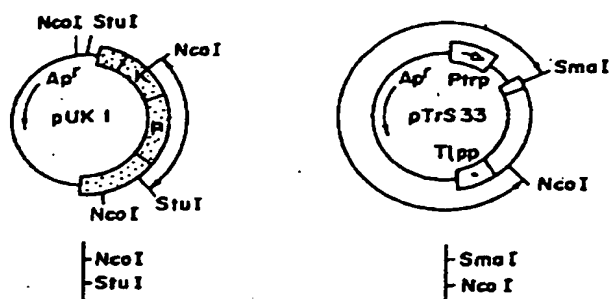
名成リンカー



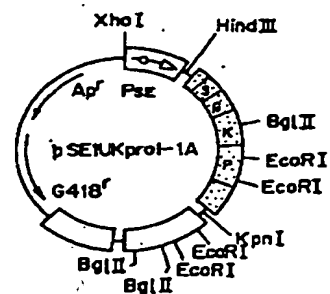
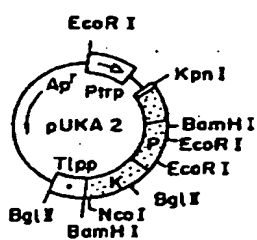
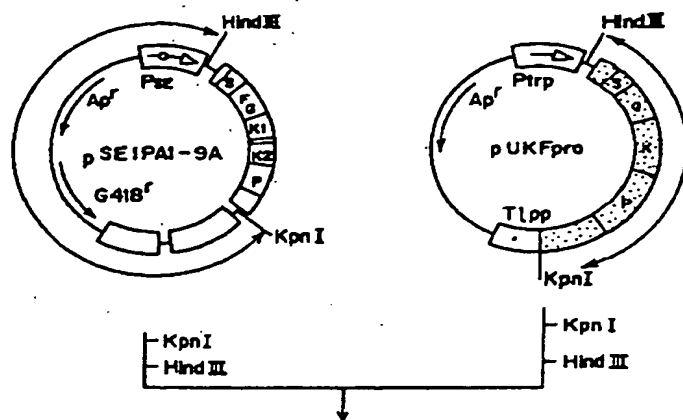
第 31 図



第 32 図

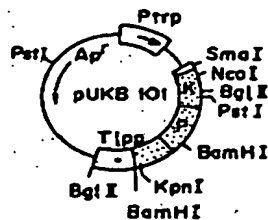
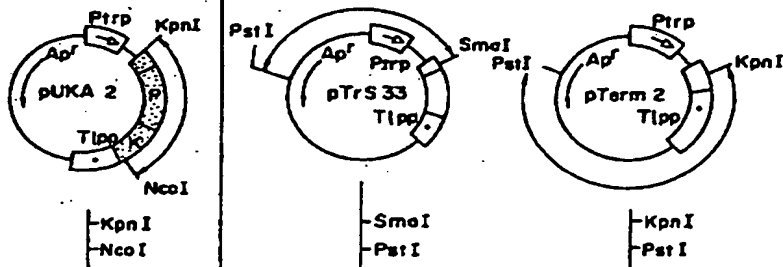


第 36 図

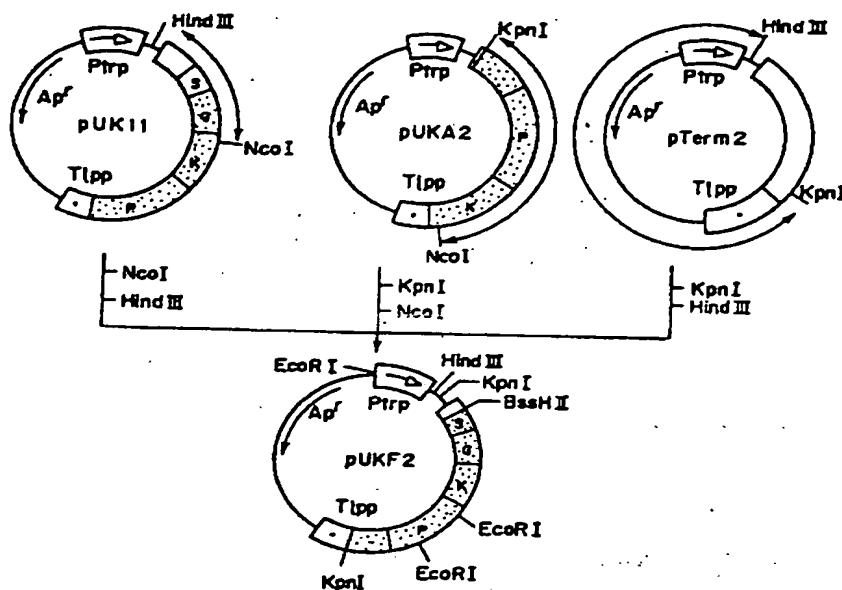


第 33 図

p GGG AAT GGT CAC TTT TAC CGA GGA AAG GCC AGC ACT GAC AC
CCC TTA CCA GTG AAA ATG GCT CCT TTC CGG TCG TGA CTG TG GTA Cp

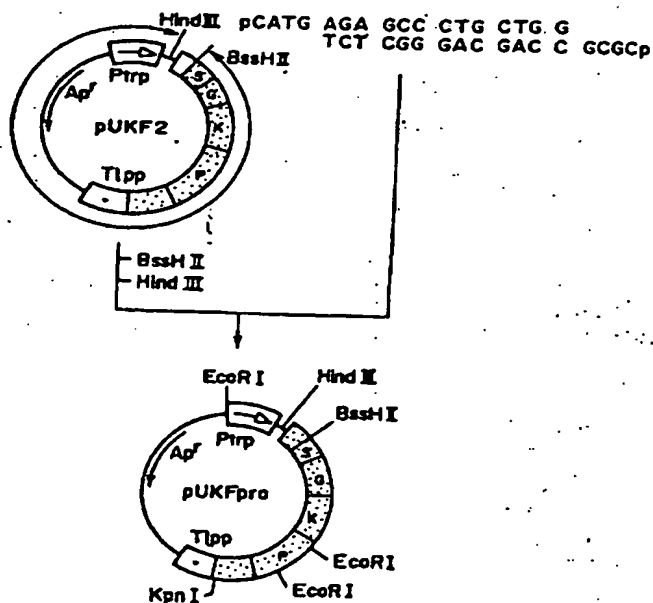


第34 図

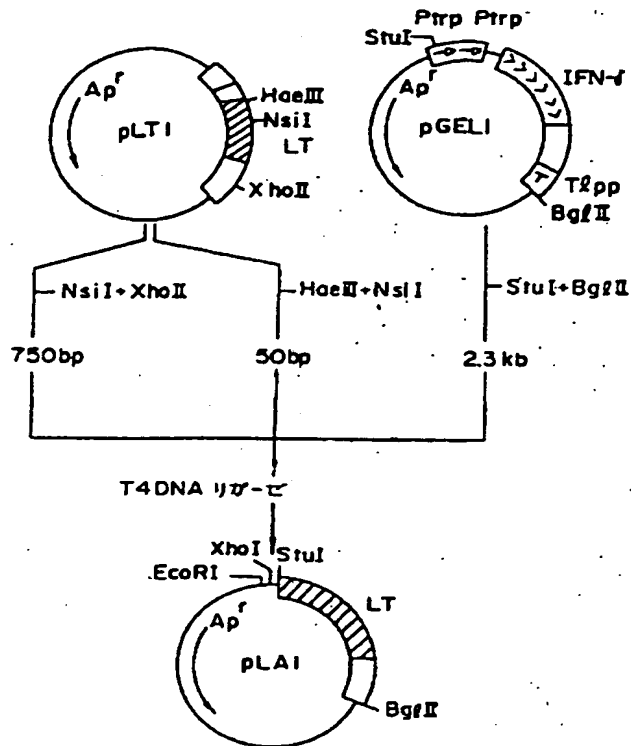


第35 図

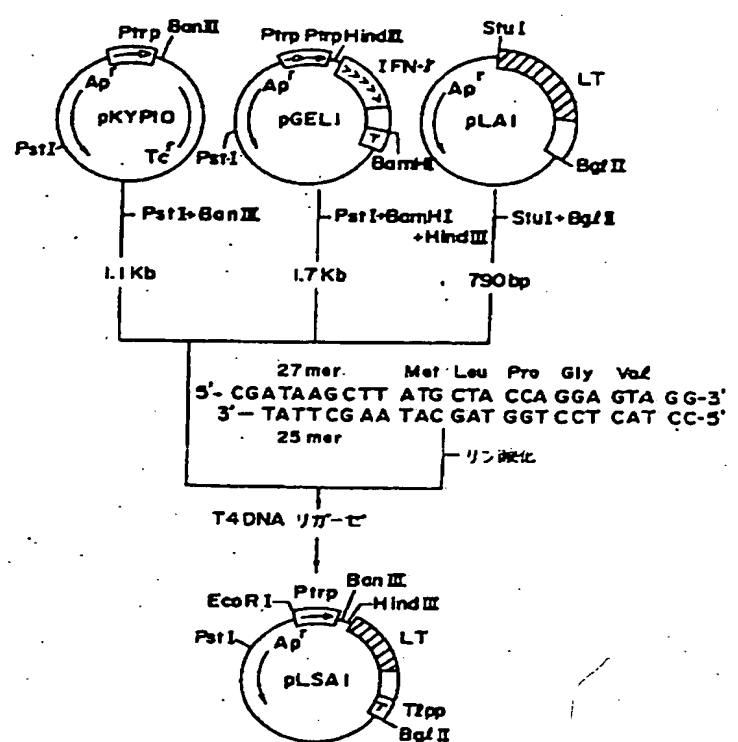
pAGCTTGTCCCGCAGCGCCGTGCGGCCCTCCTGCCGCAG
 ACAGGGGCGTCCGCGGCA GCGCGGGAGGACGGCGTCCGGTGGp
 pGCCACCGAGGGCCGCCGCGTCTAGCGCCCCGACCTCGCCAC
 CTCGGCGGCGGCGAGATCGCGGGGCTGGAGCGGTGGTACp



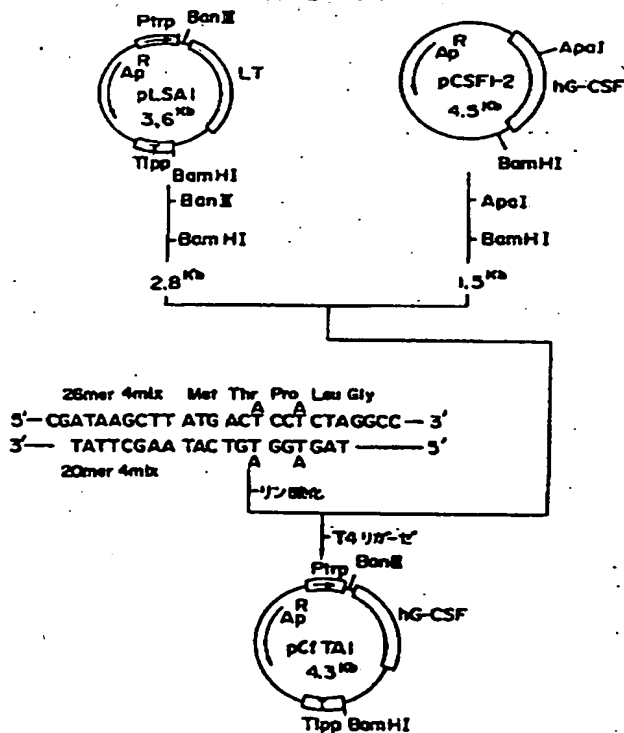
第37図



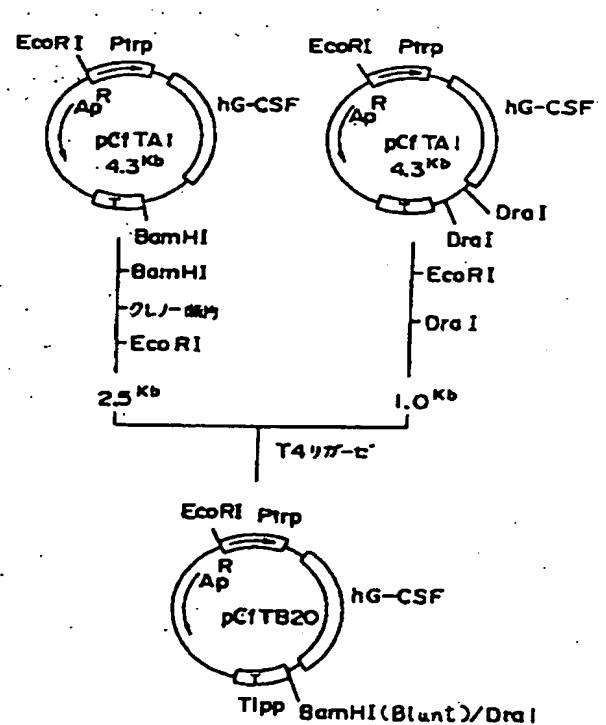
第38図



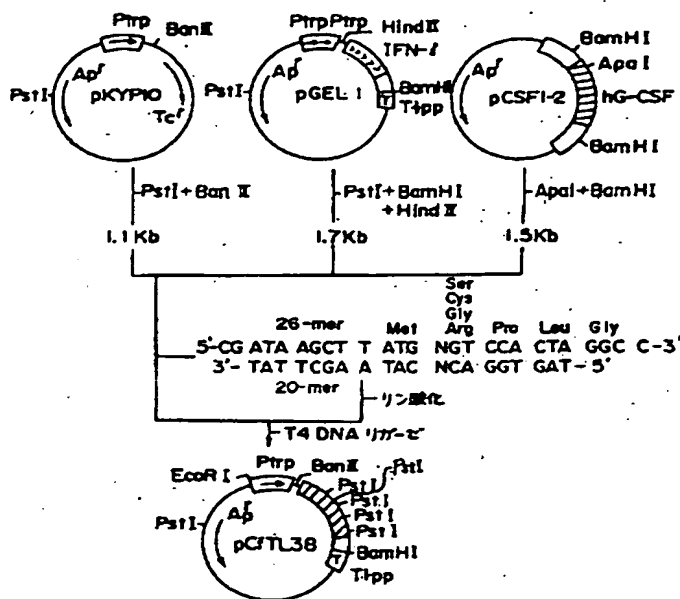
第39図



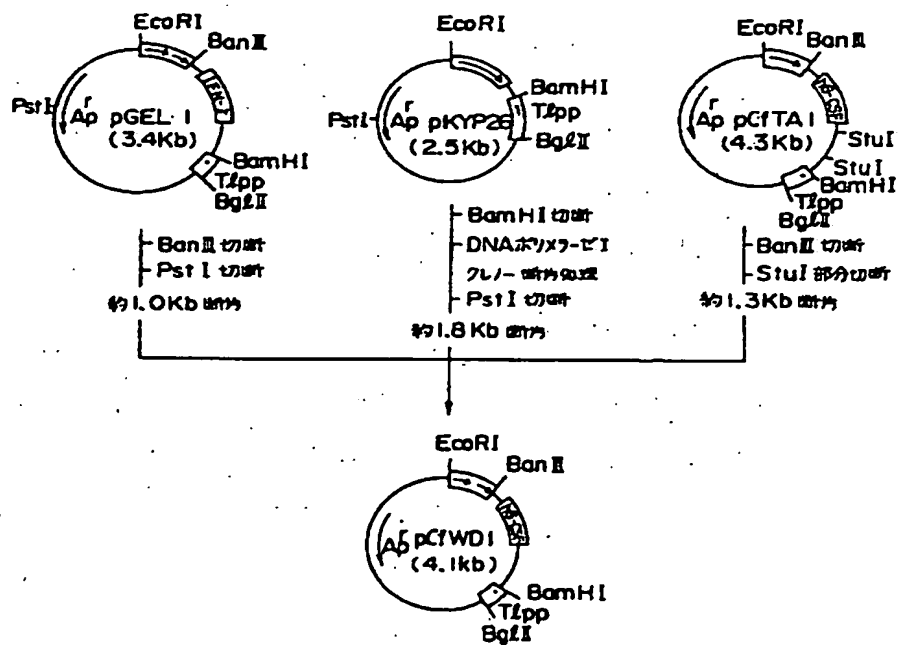
第40図



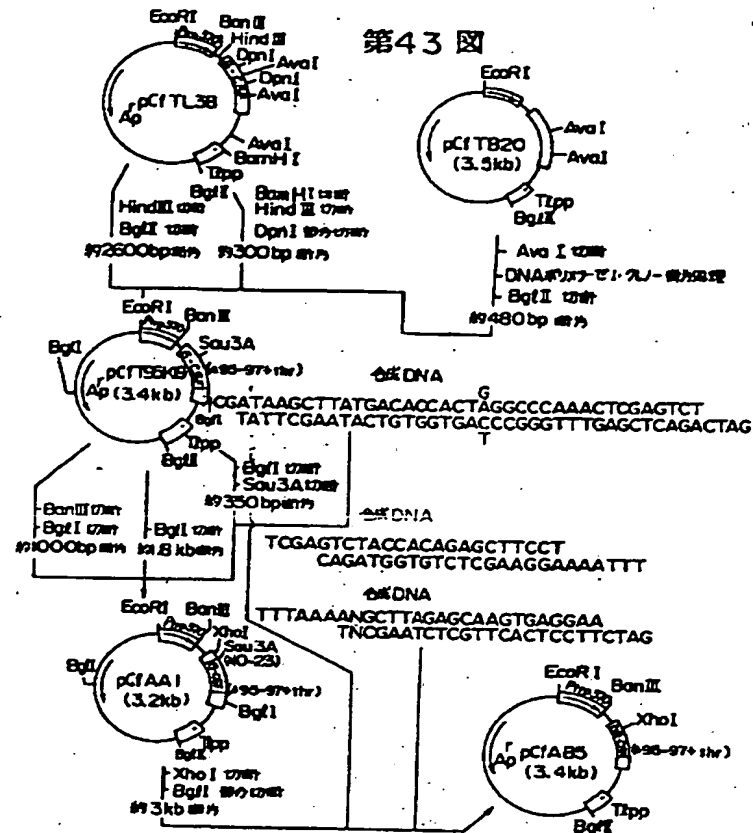
第41図



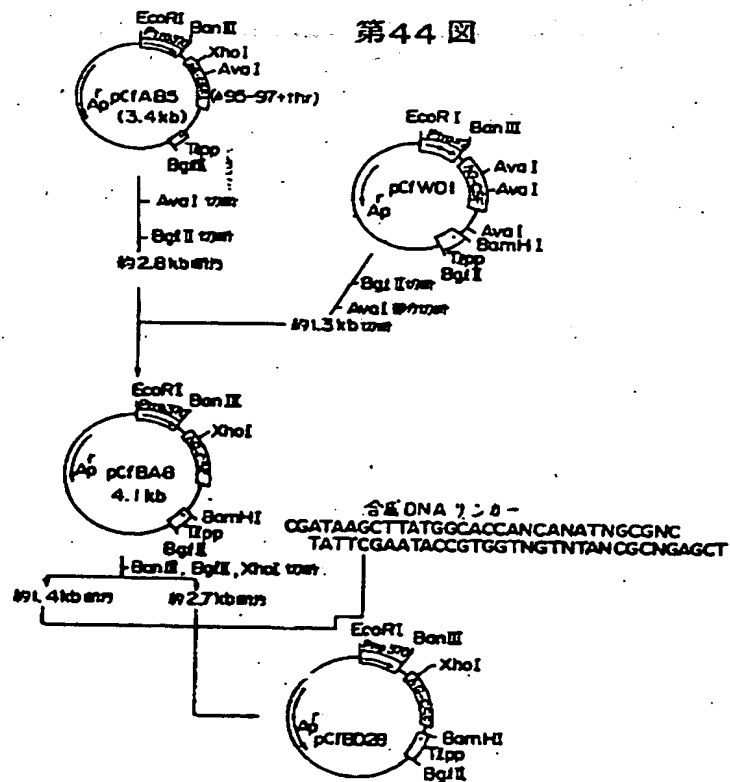
第42図



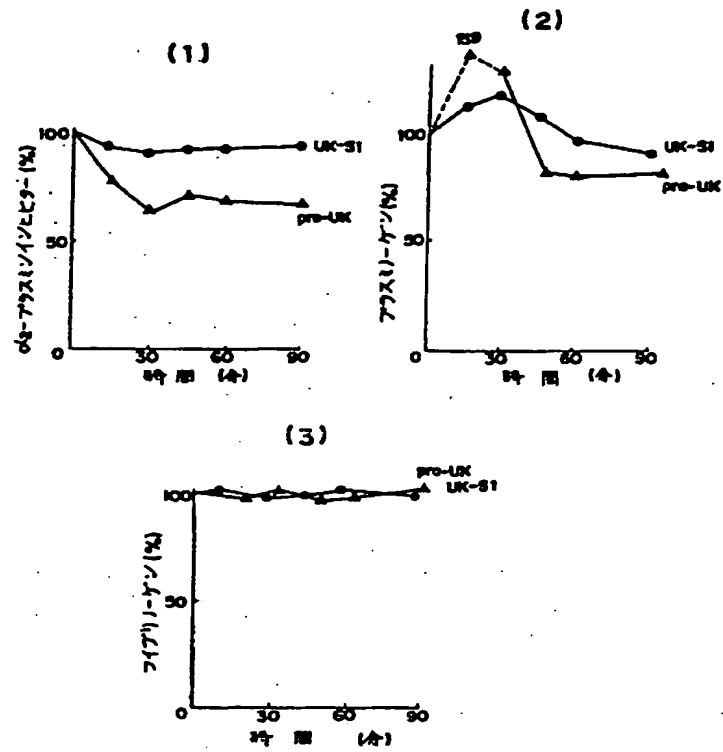
第43 図



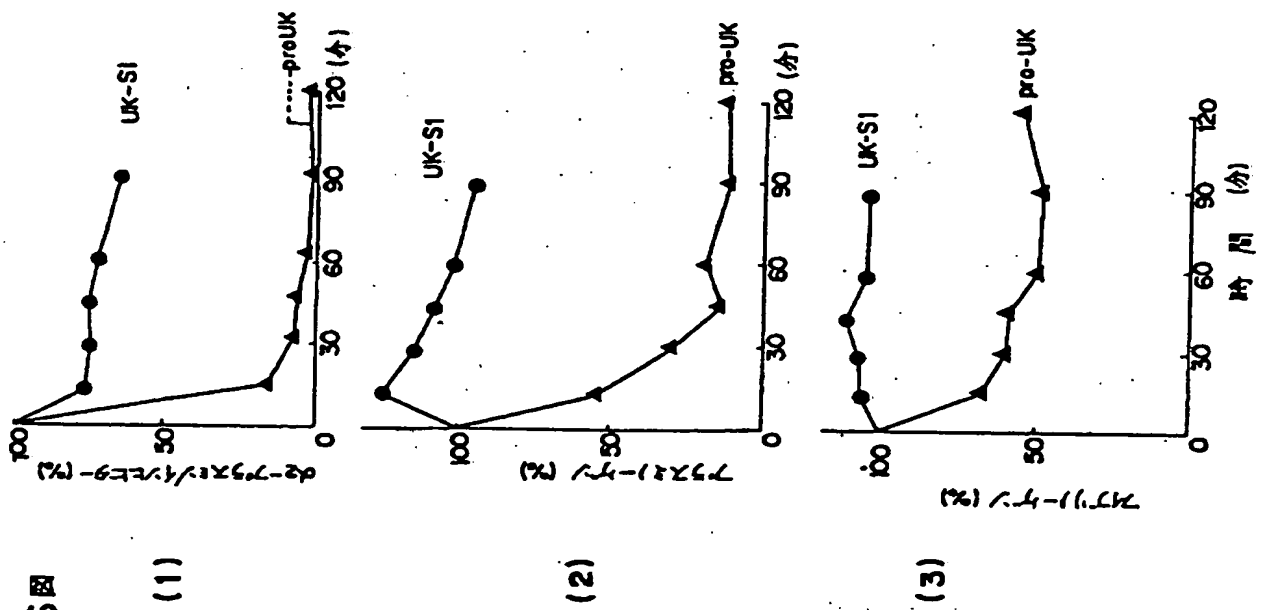
第44図



第45図

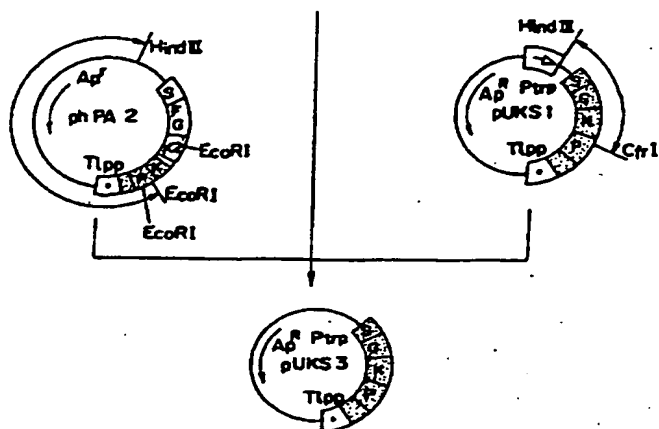


第46図

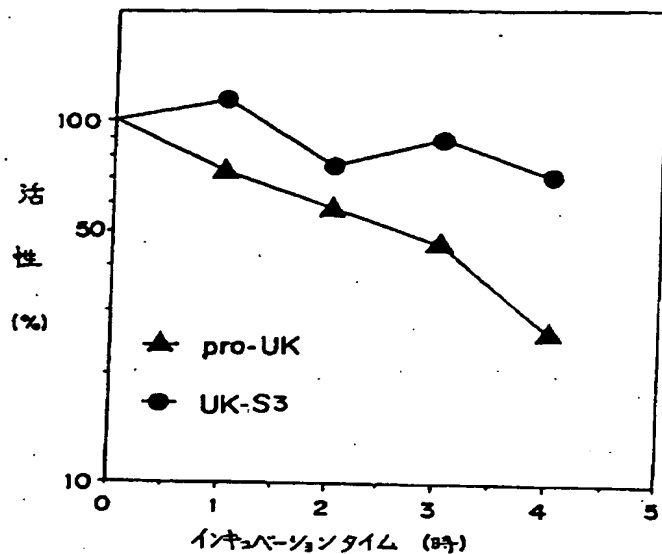


第49図

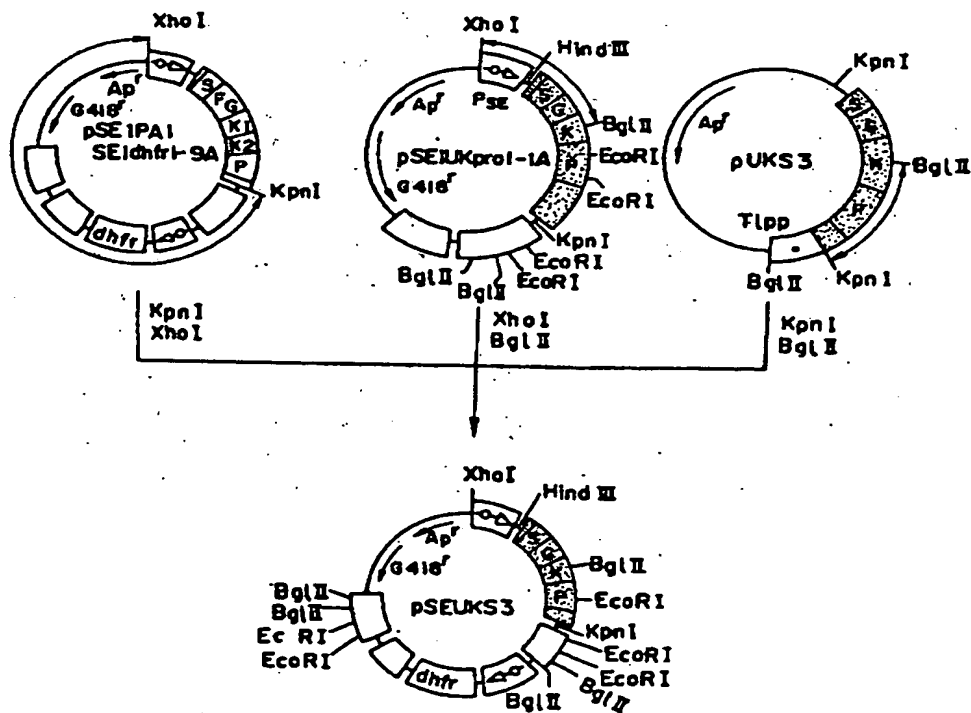
GCCCAA AAG ACT ATT CCA ACG CGT TTT AAG ATT ATT GGG GGA G
TT TTC TGA TAA GCT TGC GCA AAA TTC TAA TAA CCC CCT CTT AA



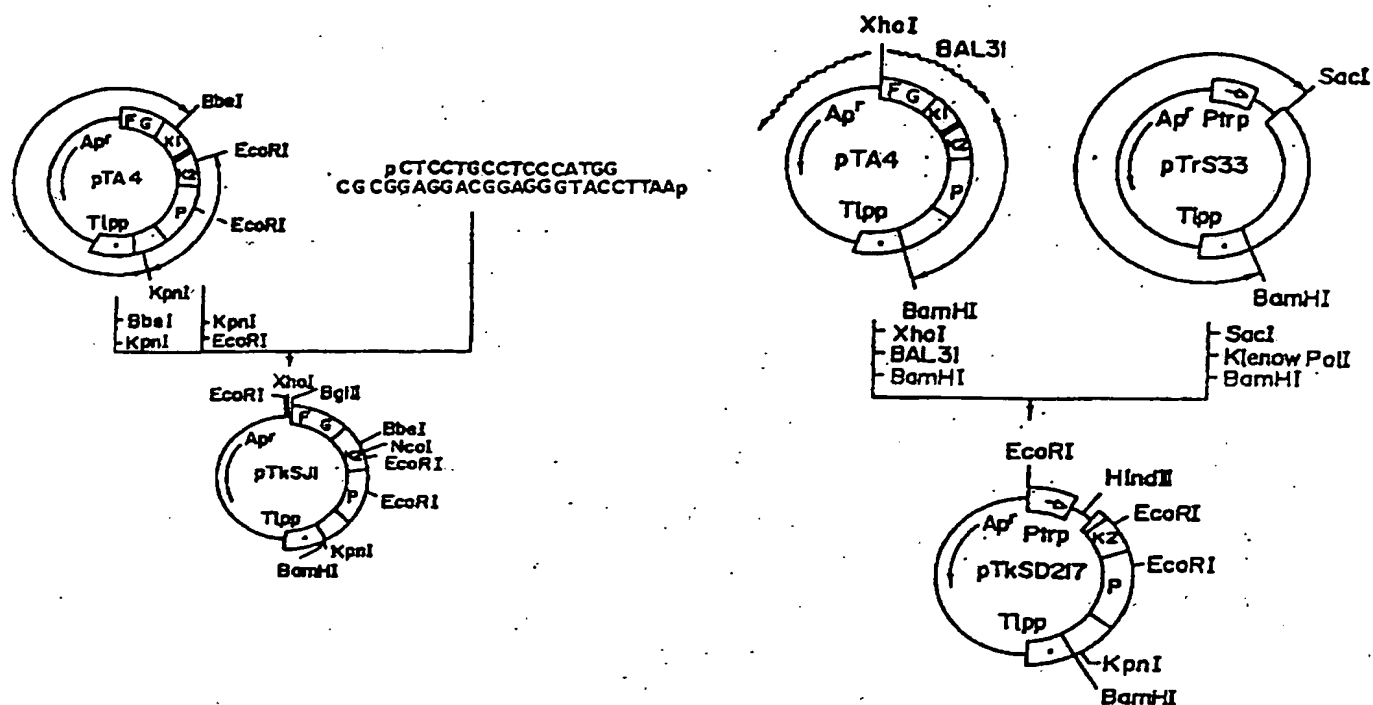
蛋白濃度 10 μ g/ml . 70°C. 4 h



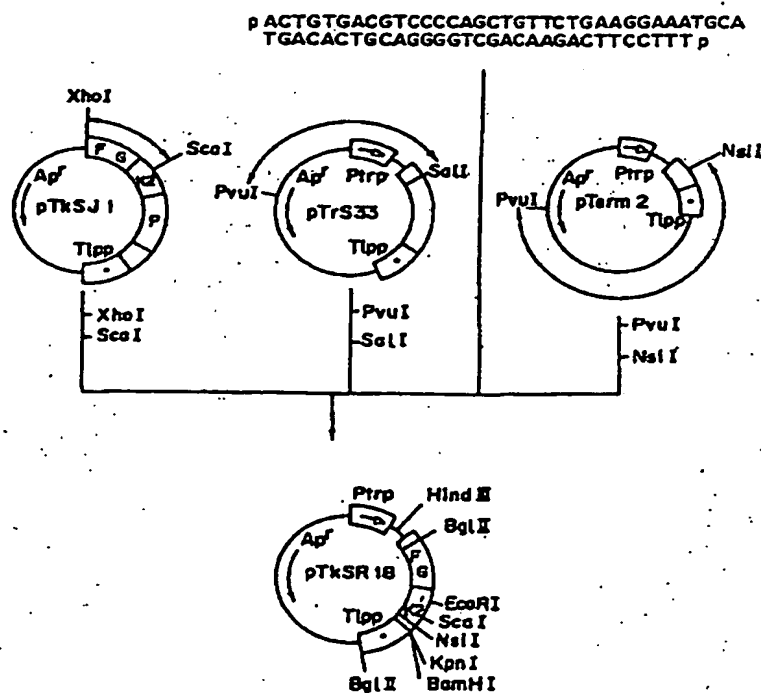
第48図



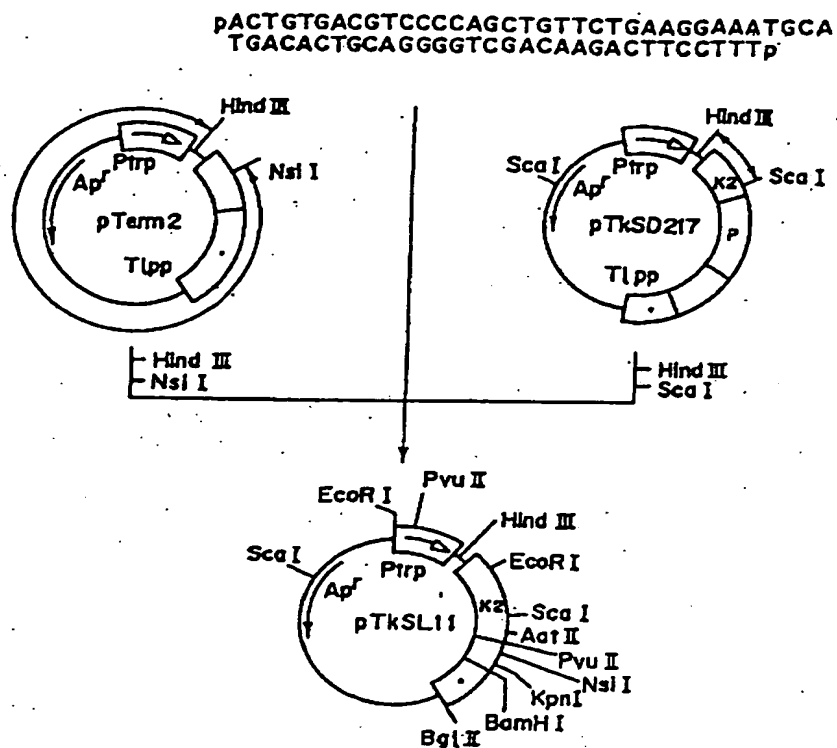
第 50 圖



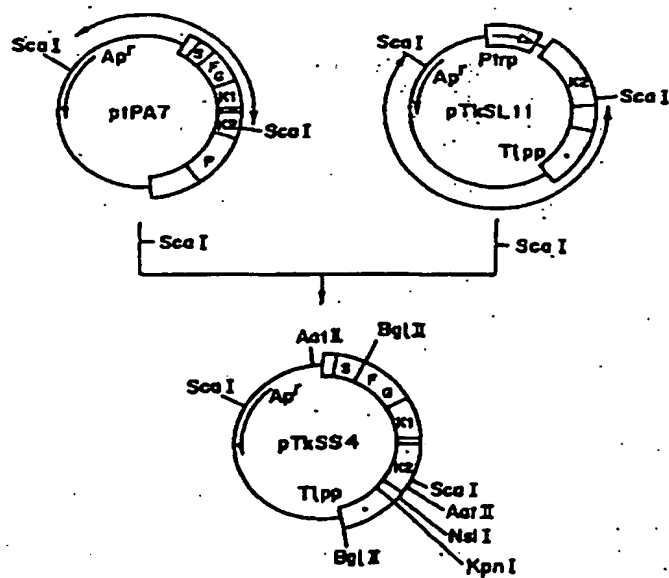
第 51 圖



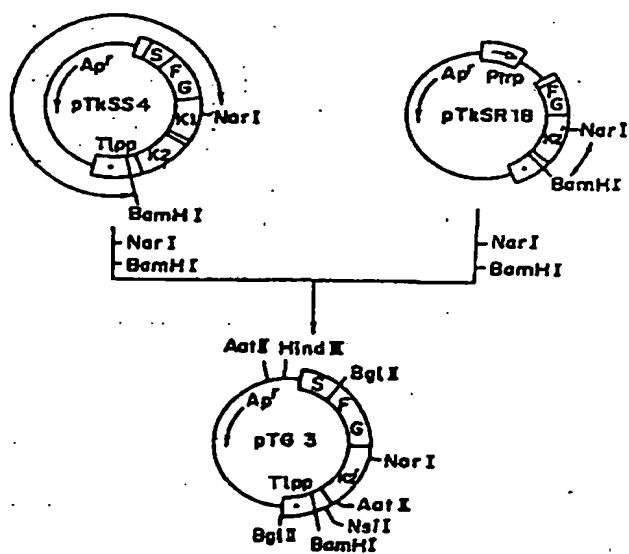
第 53 圖



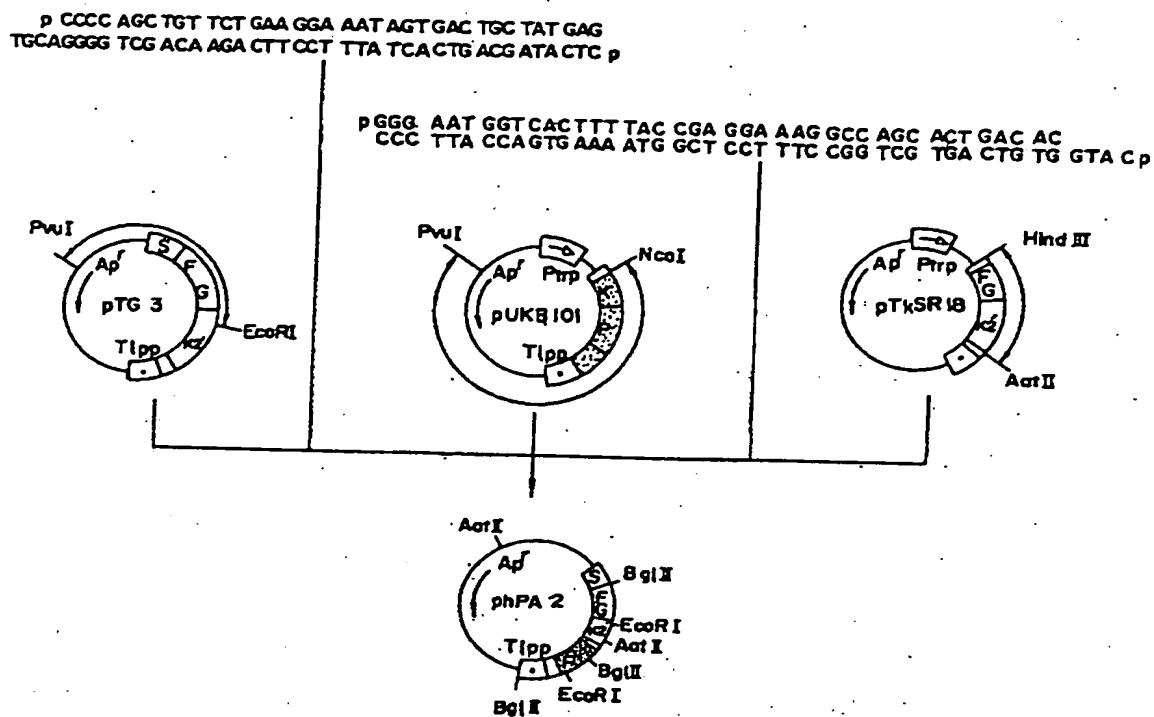
第 54 圖



第 55 圖



第 56 図



第 1 頁の続き

©Int. Cl. 8

C 12 N 1/21
5/10
9/64
15/27
15/58
15/70
15/85
21/02

C 12 P 21/02
/(C 12 N 1/21
C 12 R 1:19)
(C 12 P 21/02
C 12 R 1:19)
(C 12 P 21/02
C 12 R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

Z 8515-4B
7823-4B

ZNA H 8214-4B
C 8214-4B

手続補正 (方式)

平成 2 年 1 月 23 日

特許庁長官殿



1. 事件の表示

平成1年特許願第253097号

2. 発明の名称

新規ポリペプチド

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 100

住 所 東京都千代田区大手町一丁目6番1号

名 称 (102) 協和随研工業株式会社

(TEL: 03 - 282 - 0036)

代表者 加 藤 幹 夫



4. 補正命令の日付

平成1年12月12日 (発送日: 同1年12月26日)

5. 補正の対象

図面

6. 補正の内容

願書に最初に添付した図面の浄書・別紙のとおり (内容に変更なし)

方式
審 査

